

THÈSE

PRÉSENTÉE A

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Monsieur Denys HOUSSAY

Sujet de la thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET
EXPÉRIMENTALE DE LA MITOSE ET DES RELATIONS NUCLEO-CYTO-
PLASMIQUES ET NUCLEO-NUCLÉAIRES CHEZ THECAMOEBA SPHAERO-
NUCLEOLUS GREEFF

Soutenue le 30 mai 1970 devant la Commission d'examen composée de :

MM. Le Professeur R. COUTEAUX.....	<i>Président.</i>
Le Professeur M. BESSIS	} <i>Examineurs.</i>
Le Professeur J. ANDRÉ	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSE

PRÉSENTÉE A

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Monsieur Denys HOUSSAY

Sujet de la thèse : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET
EXPÉRIMENTALE DE LA MITOSE ET DES RELATIONS NUCLEO-CYTO-
PLASMIQUES ET NUCLEO-NUCLÉAIRES CHEZ THECAMOEBA SPHAERO-
NUCLEOLUS GREEFF

Soutenue le 30 mai 1970 devant la Commission d'examen composée de :

MM. Le Professeur R. COUTEAUX.....	<i>Président.</i>
Le Professeur M. BESSIS	} <i>Examineurs.</i>
Le Professeur J. ANDRÉ	



A Monsieur le Professeur R. COUTEAUX

qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

C'est grâce non seulement à sa haute valeur intellectuelle et à son érudition, mais aussi à son aide, son attention et sa compréhension que ce travail doit d'avoir atteint son terme.

Qu'il agrée l'expression de ma respectueuse admiration et l'assurance de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. BESSIS

qui a eu l'extrême bonté de me guider pendant toute la durée de mes études médicales et de m'orienter vers la recherche.

C'est lui qui, en m'accueillant dans son laboratoire et en me conseillant avec une grande bienveillance m'a fourni tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Qu'il veuille bien croire à la sincérité de mes remerciements et de mon respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur J. ANDRE

qui a bien voulu faire partie du jury de cette thèse.

Au cours de ce travail, il m'a souvent aidé de sa grande compétence. Il m'a montré, par son exemple, ce à quoi la recherche peut atteindre lorsqu'elle s'allie à l'honnêteté intellectuelle et au savoir.

Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde estime et de ma respectueuse gratitude.

A tous ceux qui ont pris une part active à ce travail :

En particulier, à Monsieur Michel PRENANT

modèle du technicien supérieur de recherche ; son sens de l'observation, son intelligence et son habileté, ont rendu possible la réalisation de ce travail dont il a assuré plus que la partie technique. Avec mes remerciements et en témoignage de mon amitié ainsi qu'à Madame Geneviève PRENANT qui m'a si souvent apporté l'aide de son talent pour les photographies de cette thèse.

A Monsieur J.-P. THIERY

qui a bien voulu me diriger dans mon travail aux moments difficiles. A chaque instant j'ai trouvé auprès de lui de constants encouragements. Qu'il soit remercié plus que je ne puis le faire ici pour les conseils de toutes sortes qu'il m'a prodigués.

A Madame A.-G. COMBRISSE

qui est à l'origine de mon orientation vers l'hématologie et la recherche et qui a eu l'attention exquise, inexplicable et courageuse de m'accueillir dans son laboratoire. Elle connaît je l'espère, mon sentiment de respectueuse reconnaissance pour l'enseignement qu'elle m'a donné et mon admiration pour sa rigueur intellectuelle et ses grandes qualités humaines. Elle en tire, je pense, la conclusion inéluctable de mon attachement tout dévoué.

A Monsieur F. ZAJDELA et à son laboratoire, tout particulièrement à P. TAMBOURIN, F. WENDLING et O. PIERRE,

ils savent aussi bien que moi l'aide inappréciable qu'ils m'ont apportée tant sur le plan technique que sur le plan intellectif et affectif.

A Monsieur J.F. LENNON

pour son soutien en physique ou moral. En toute amitié.

A Madame J. BRETON

qui m'a initié aux arcanes de la microscopie
électronique et m'a guidé dans l'interprétation
délicate d'images en principe figuratives.

*A tous mes collègues et amis de l'Institut de Pathologie
Cellulaire et du Laboratoire de recherches hématologiques
et transfusionnelles, qui ont peu ou prou apporté leur
concours à la réalisation de ce travail.*

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	11
II. MATERIEL ET TECHNIQUES	13
A. ISOLEMENT ET CULTURE DE THECAMOEBA SPHAERO-NUCLEOLUS	13
B. OBSERVATION DES AMIBES EN MICROSCOPIE PHOTO-NIQUE	14
1. <i>Dans son milieu de culture</i>	14
2. <i>Entre lame et lamelle, mesure du volume</i>	14
3. <i>Microscope, Photographie, Cinéma</i>	16
C. PREPARATION ET EXAMEN DES COUPES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	16
1. <i>Fixation et inclusion des amibes</i>	16
2. <i>Confection et coloration des coupes</i>	16
D. TECHNIQUES DE MICROCHIRURGIE	17
1. <i>Micro-instruments</i>	17
2. <i>Préparation de la chambre à huile</i>	17
3. <i>Culture des amibes après intervention</i>	17
4. <i>Micromanipulateurs</i>	17
5. <i>Interventions microchirurgicales</i>	17
E. TECHNIQUES D'AUTORADIOGRAPHIE	19
1. <i>Marquage</i>	19
2. <i>Grefe nucléaire</i>	19
3. <i>Expériences témoins</i>	19
4. <i>Fixation et inclusion</i>	20
5. <i>Confection des coupes et dépose de l'émulsion</i>	20
6. <i>Coloration et examen des coupes</i>	20
III. ETUDE CYTOLOGIQUE DE LA THECAMOEBA SPHAERO-NUCLEOLUS	21
I. MORPHOLOGIE DE L'AMOEBA SPHAERONUCLEOLUS EN INTERPHASE	22
A. ASPECT GENERAL DE L'AMIBE VIVANTE	22
B. ETUDE DES CONSTITUANTS CYTOPLASMIQUES	23
1. <i>Membrane cytoplasmique</i>	23
2. <i>Lame ectoplasmique pseudopodiale</i>	23
3. <i>Plasma pulsatile</i>	24
4. <i>Vacuoles digestives</i>	25
5. <i>Mitochondries et granulations</i>	26
6. <i>Corps de Golgi</i>	26
7. <i>Ergastoplasme</i>	27
8. <i>Fibrilles</i>	27
9. <i>Inclusions et organites cytoplasmiques divers</i>	27
10. <i>Absence de centrosphère</i>	28

C. ETUDE DU NOYAU EN INTERPHASE	28
1. <i>La membrane nucléaire</i>	28
2. <i>Le suc nucléaire</i>	29
3. <i>Le caryosome</i>	29
II. ETUDE DE LA MITOSE D'AMOEBA SPHAERONUCLEOLUS ..	30
A. MITOSE PROPREMENT DITE	30
1. <i>Vacuolisation du caryosome</i>	30
2. <i>Apparition de filaments dans le suc nucléaire</i>	31
3. <i>Désagrégation du caryosome</i>	31
4. <i>« Noyau vide »</i>	32
5. <i>Métaphase</i>	33
6. <i>Séparation des chromosomes</i>	34
7. <i>Séparation des noyaux</i>	35
8. <i>Cytodiérèse</i>	36
B. RECONSTITUTION DU CARYOSOME	36
III. CONDITIONS DE VIE EN MILIEU NATUREL ET EN CULTURE	38
IV. DIAGNOSE	39
IV. RELATIONS NUCLEO-CYTOPLASMIQUES	43
A. INFLUENCE RESPECTIVE DU NOYAU ET DU CYTOPLASME SUR LA CROISSANCE EN VOLUME ET SUR LA DUREE DE L'INTERPHASE	43
1. <i>Mesure de la croissance des amibes normales</i>	44
2. <i>Mesure de la croissance des amibes greffées</i>	45
3. <i>Mesure de la croissance des amibes 1N+2C et 2N+2C</i>	45
4. <i>Volume prémitotique</i>	46
5. <i>Comparaison des deux séries expérimentales</i>	47
6. <i>Discussion</i>	50
B. INFLUENCE DE L'ABLATION DES NOYAUX SUR LA MORPHOLOGIE DES DIFFERENTS ORGANITES	53
1. <i>Devenir des amibes énucléées</i>	54
2. <i>Méthode d'étude</i>	54
3. <i>Résultats</i>	54
4. <i>Discussion</i>	55
V. RELATIONS NUCLEO-NUCLEAIRES CHEZ LES AMIBES BINUCLEÉES.	57
A. AMIBES NORMALES MARQUEES	57
B. GREFFE DU NOYAU D'UNE AMIBE MARQUEE DANS UNE AMIBE NORMALE	57
C. ETUDE DE LA MITOSE	58
D. TRANSFERT DE MARQUAGE DANS LES AMIBES GREFFÉES DEPUIS 18 HEURES ET PLUS	58
E. EXPERIENCES TEMOINS	58
F. DISCUSSION	59

VI. MITOSE DES AMIBES PLURINUCLEEES ET ANOMALIES EXPERIMENTALES DE LA MITOSE	61
A. MITOSE « HABITUELLE » DES AMIBES BINUCLEEES ..	61
1. <i>Le cycle de modification des noyaux</i>	61
2. <i>Les noyaux se divisent de façon synchrone</i>	61
3. <i>L'étirement des noyaux se fait dans une direction variable</i>	62
4. <i>La division cytoplasmique donne naissance à deux, trois ou quatre amibes</i>	62
5. <i>Division du plasma pulsatile</i>	62
6. <i>Répartition des noyaux dans les cellules filles</i>	62
B. MITOSES « HABITUELLES » DES AMIBES PLURINUCLEEES	64
C. ANOMALIES SPONTANEEES OU EXPERIMENTALES DE LA MITOSE	65
1. <i>Division nucléaire sans division cytoplasmique</i>	65
2. <i>Blocage d'un noyau en mitose</i>	65
3. <i>Cytodiérèse sans caryocinèse</i>	66
4. <i>Fusions nucléaires et stathmocinèses</i>	66
5. <i>Raccourcissement du cycle mitotique</i>	66
6. <i>Cytodiérèse extraordinaire</i>	67
D. DISCUSSION	67
VII. CONCLUSIONS	69
BIBLIOGRAPHIE	73

INTRODUCTION

Un certain nombre de penseurs scientifiques, tels que F. Houssay, P. Theillard de Chardin, et H. Laborit, distinguent implicitement ou explicitement plusieurs étapes dans la progression scientifique. La première ou statique consiste en une description simple des faits. Les systématiques et l'anatomie en sont les exemples les plus caractéristiques. Cette statique consiste en somme à faire passer le fait observé à l'état d'expression verbale. C'est le premier degré de l'abstraction scientifique.

La deuxième étape ou cinématique étudie un système isolé et sa régulation au sens cybernétique du terme. C'est le cas par exemple de la physiologie telle que l'entendait Claude Bernard. La cinématique n'étudie donc que des relations de causalité directes ou indirectes, elle limite son investigation aux relations de permutation ou aux ribambelles au sein d'un sous ensemble, pour parler le langage des mathématiques modernes.

La troisième étape ou dynamique ou science des structures établit enfin l'ensemble des fonctions, transformations et relations appliquées sur un fait ou un ensemble de faits. Les exemples les plus démonstratifs sont représentés par les relations d'incertitudes et surtout par les tentatives de « théories unitaires » en physique. La biologie est bien trop abstruse pour s'être profondément engagée dans cette voie où toute la complexité d'un groupe de phénomènes s'exprime par une seule abstraction simple.

Faisant nôtre cette analyse, nous avons cherché les domaines et les méthodes qui nous permettraient de franchir rapidement les deux premières étapes de cette progression pour en arriver à la troisième qui seule est explicative. C'est dans ce but que nous nous sommes tournés vers l'étude du fonctionnement cellulaire et que notre principale technique a été la microchirurgie. En recueillant la bibliographie des travaux effectués par cette méthode, nous nous sommes en effet rendus compte qu'une technique aussi directement expérimentale oblige le chercheur à se placer dans une optique dynamique (58).

Dès le temps des précurseurs, tels que Barber (1), Chabry (15-16) et Schouten (92), la microchirurgie a permis de pénétrer au cœur des phénomènes fondamentaux de la vie de relation cellulaire. La génération suivante, commencée avec Taylor et Farber (95) et que marquent les grands noms de la microchirurgie : Chambers (17 à 22) et Comandon

et Fonbrune (26 à 35 et 45) est allée encore plus loin dans ce sens. Malheureusement les connaissances statiques ou cinématiques accumulées à leur époque étaient largement insuffisantes pour leur permettre d'ébaucher un commencement d'explication de leurs expériences. C'est cette insuffisance de connaissances qui va entraîner un oubli presque total des techniques de microchirurgie. Seuls Danielli et ses collaborateurs (36 à 41, 55-56-65-66-74-75) s'en serviront pour mettre en évidence l'hérédité cytoplasmique et en étudier les modalités. C'est seulement lorsque des connaissances suffisantes auront été acquises que les études pourront reprendre, marquées tout spécialement par les divers travaux de Brachet (4 à 7) sur *Amoeba proteus* et les expériences fondamentales de Briggs et King (10 à 12, 61). Bien d'autres noms pourraient maintenant être cités comme ceux de Tartar (94) Kroeger (62) Prescott (82 à 86) et Goldstein que nous retrouverons au cours de ce travail, et cela en se cantonnant strictement à notre domaine particulier et en excluant les nombreux travaux d'électrophysiologie et toutes les études portant sur la cellule nerveuse.

Personnellement nous avons choisi d'explorer les relations cellulaires de l'amibe sur laquelle travaillaient encore Comandon et Fonbrune : *Amoeba sphaeronucleus*. Ce travail représente les premiers éléments recueillis au cours de cette étude. Dans notre recherche qui se voulait dynamique, nous nous sommes immédiatement heurtés à l'absence de connaissances statiques et cinématiques sur l'objet que nous étudions. Il nous a donc fallu reprendre les recherches dans ce domaine et aborder la morphologie et la cytologie de notre amibe. Nous avons pu ensuite accumuler un certain nombre de relations nucléocytoplasmiques ou nucléonucléaires et remonter ou non à leur causalité immédiate. Ce travail s'arrête donc au seuil de la dynamique qui nous permettra, nous l'espérons, d'établir par la suite quelques structures dans ces relations.

II. MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A. ISOLEMENT ET CULTURE DE *THECAMOEBA SPHAERONUCLEOLUS*

Le milieu de vie privilégié de ces amibes dans la nature est constitué par les rhizoïdes des mousses poussant sur les vieux murs.

Pour isoler l'*Amoeba sphaeronucleolus*, il suffit de prélever de petits échantillons de mousse avec la terre sur laquelle ils se développent. On prépare ensuite de la gélose non nutritive (gélose en paillettes) à 18 ‰ dans de l'eau distillée. Cette gélose est coulée dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, à raison de 12 cm³ de gélose par boîte.

Plusieurs techniques sont alors possibles :

- 1) Déposer les échantillons de mousse dans un tube à essai, contenant de l'eau distillée, et agiter fortement le tube. Répandre ensuite le contenu à la surface de la gélose.

- 2) Déposer directement les échantillons de mousse sur la gélose.

Quoi qu'il en soit, il est possible, au bout de quelques jours, de distinguer à la loupe binoculaire (X 30) l'*Amoeba sphaeronucleolus*, ainsi que d'autres espèces qui se développent à la surface de la gélose. A ce moment, on prélève à l'aide d'une pipette à bouche le nombre d'individus que l'on désire.

Ils sont ensuite examinés au microscope pour éviter toute confusion d'espèce. On les dépose alors sur la couche de gélose d'une nouvelle boîte de Pétri.

Les amibes, se déplaçant, vont ensemençer ce milieu de culture, par un mécanisme que nous verrons par la suite. Il importe que, outre les germes ensemençés, de petites amibes soient présentes dans la culture; l'*Amoeba sphaeronucleolus* ayant besoin de ces deux éléments pour se développer convenablement et durablement.

Ainsi se trouve réalisée une culture dans de bonnes conditions. Pour la maintenir, nous repiquons les germes sur de la gélose nutritive et nous entretenons leur souche à part. Le rythme de repiquage des amibes est variable, et ne dépend que de la dessiccation de la couche de gélose. Il varie, selon les conditions atmosphériques, de 1 à 4 semaines. De nouvelles boîtes de Pétri reçoivent leur couche de gélose, et 3 ou 4 jours plus tard, les germes sont ensemençés en partant des colonies isolées sur gélose nutritive et mises en suspension dans de l'eau distillée : on dépose une douzaine de gouttes de la suspension sur la gélose. La boîte

est ensuite agitée, pour répartir les germes de façon à peu près homogène. Le lendemain, on découpe un petit carré de gélose riche en amibes dans une vieille boîte de culture et on le dépose sur la couche de gélose déjàensemencée de germes. En quelques jours, les petites amibes auront envahi toute la boîte et se seront enkystées. Les amibes *sphaeronucleolus* descendent alors du carré de gélose et se développent.

Nous n'avons cherché à typer, ni les germes, ni les petites amibes dont se nourrit *Amoeba sphaeronucleolus*. Pour ces dernières, nous indiquerons seulement qu'il s'agit d'amibes *limax* mesurant environ 10 à 15 microns. Elles possèdent un noyau à nucléole rond central. Ces amibes s'enkystent dès que le milieu devient trop peu humide. Un montage photographique permet de voir l'aspect de leur trophozoïte et de leur kyste (cf. page 00).

Comme on peut le constater, notre méthode d'isolement et de culture, partiellement empruntée à Comandon et Fonbrune, diffère complètement de celle utilisée par Mattes (68) Wittman (97) et Horstmann (57 *bis*) qui cultivent *Amoeba sphaeronucleolus* dans de l'eau d'aquarium contenant des oscillaires et de nombreux micro-organismes. Ils trouvent l'amibe en grand nombre, sur les algues situées à la partie supérieure de l'aquarium.

B. OBSERVATION DES AMIBES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

1. Observation de l'amibe dans son milieu de culture.

Il est possible d'examiner directement l'amibe en fond clair sur la couche de gélose où elle est cultivée. Etant donné l'épaisseur (3 à 4 mm) et les multiples défauts optiques de ce milieu, on ne peut, dans ces conditions, dépasser des grossissements de 200 fois. Cela permet néanmoins de se rendre compte de la forme générale de l'amibe en déplacement sur un milieu solide.

2. Observation de l'amibe entre lame et lamelle. Mesure du volume cellulaire.

L'*Amoeba sphaeronucleolus* étant volumineuse, il est impossible de l'examiner sans précautions entre lame et lamelle : il faut lui ménager un espace d'au moins 20 microns entre les parois.

Nous utilisons dans ce but une petite lamelle carrée (5 mm × 5 mm) dont les coins sont épaissis à la microforge, selon la technique de Fonbrune (45), (fig. 1).

L'amibe est prélevée sur la couche de gélose à l'aide d'une pipette à bouche contenant de l'eau distillée. Elle est déposée sur la lame dans une goutte d'eau et recouverte de la petite lamelle. Dans le cas où l'on veut poursuivre l'observation plusieurs jours, la petite lamelle est recouverte d'huile, puis d'une lamelle ordinaire.

Cette méthode d'observation permet également de mesurer avec une assez grande précision le volume de l'amibe. En effet, l'amibe se trouve ainsi dans une petite chambre d'épaisseur déterminée, et dont les deux faces sont parallèles. Elle prend la forme d'un petit cylindre aplati dont la section droite est grossièrement ovale. Nous admettons que nous pouvons assimiler cette section à un cercle dont le diamètre est égal à la moyenne du grand et du petit diamètre de l'amibe.

L'amibe comprimée est entourée d'un anneau de hyaloplasme. Comme cela est visible sur le schéma, le diamètre est mesuré à mi-distance des bords de cet anneau pour corriger l'arrondi de ses contours.

Pour obtenir le volume de la cellule, il suffit d'appliquer la formule

$$V = \frac{\pi D^2 h}{4}$$

où V est le volume, D le diamètre moyen et h la hauteur.

La hauteur des « pieds » de la lamelle est mesurée par deux méthodes. Grâce à un micromètre oculaire, sur la microforge de Fonbrune on mesure l'épaisseur totale de la sphère servant de « pied ». D'autre part, en se servant de la vis micrométrique étalonnée du microscope, on mesure la différence de hauteur entre un trait tracé sur la face supérieure de la lame et un autre tracé sur la face inférieure de la lamelle. De nombreuses mesures sont effectuées dont on fait la moyenne. Il faut noter que la hauteur des « pieds » de part et d'autre de la lamelle n'est pas identique. Selon qu'on utilise la lamelle d'un côté ou de l'autre, on dispose d'une chambre de hauteur h ou de hauteur h'.

Pour toutes nos mesures nous nous sommes servis de la même lamelle à pieds. Les hauteurs des chambres qu'elle détermine sont respectivement, h = 23,8 microns et h' = 36,9 microns.

Les amibes de petite taille sont placées sous le petit côté, les amibes de grande taille sous l'autre. La comparaison des deux côtés de la lamelle a été effectuée en mesurant 30 amibes de taille moyenne sous l'un et l'autre côté.

Pour que la hauteur de la chambre soit constante d'une mesure à l'autre, il faut ajouter ou enlever de l'eau distillée entre lame et lamelle de telle sorte que le ménisque soit situé exactement au bord de la lamelle. Ainsi, la lamelle est plaquée sur la lame par une force de tension superficielle toujours identique.

Il reste à évaluer le grand et le petit diamètre de l'amibe. Cette mesure est effectuée, grâce à un micromètre oculaire (Nachet x 11) à un grossissement total de 550 fois. Chaque diamètre est mesuré trois fois successivement; c'est la moyenne de ces mesures qui est utilisée pour calculer le volume.

Une fois l'observation ou les mesures terminées, la lamelle est enlevée, l'amibe aspirée à nouveau dans la pipette à bouche et remise en culture si on le désire.

3. Microscope - Photographie - Cinéma.

Toutes nos observations ont été faites sur un microscope binoculaire Leitz Laborlux II équipé d'un condenseur longue frontale Wild, d'objectifs Wild Fluotar (X 10, X 20, X 40, X 100), et d'oculaires Leitz X 10. Ce microscope possède une lentille intermédiaire multipliant le grossissement final par 1,25 ; il permet une observation en fond clair ou en contraste de phase. Il comporte en outre un tube en dérivation pour la photographie ou le cinéma. Ce tube est muni soit d'un oculaire X 5 Nachet pour le cinéma, soit d'un oculaire Leitz X 6 ou X 10 selon les besoins de la photographie.

Les photographies sont prises grâce à un boîtier BBT sur du film Addox KB 14.

La caméra de cinéma est une Arriflex 16 mm. Le film utilisé est le Ferrania inversible panchromatique 18 Din. Les séquences de manipulation sont filmées à 16 images par seconde et les cellules sont suivies à une cadence de une ou cinq images par seconde.

C. PREPARATION ET EXAMEN DES COUPES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1. Fixation et inclusion des amibes.

Chaque amibe est prélevée individuellement sous la loupe binoculaire et déposée dans une goutte de glutaraldéhyde à 3 % sur une lame.

La lame est mise au frigidaire à 4° C pendant 30 minutes.

L'amibe est ensuite lavée dans une goutte de tampon phosphate à pH 7,2. On l'introduit alors dans une goutte d'acide osmique à 1 % et on place de nouveau la lame au frigidaire pendant 30 minutes.

Après rinçage à l'eau distillée, l'amibe est intercalée entre deux gouttes de gélose. La gélose est découpée et soudée, le plus près possible de l'amibe, à l'aide d'une épingle rougie à la flamme.

Le petit bloc de gélose ainsi constitué subit une déshydratation de 30 minutes dans chacun des bains suivants : Alcool à 70, Alcool à 90, deux bains d'alcool absolu, deux bains d'oxyde de propylène.

Puis il est laissé une nuit dans le mélange d'epon sans durcisseur à la température du laboratoire. Retiré, il est placé dans le mélange epon et durcisseur et mis à l'étuve à 60° pendant 24 heures.

2. Confection et coloration des coupes.

Une fois la pyramide taillée, les amibes sont coupées sur Ultratome L K B 4801-A et recueillies sur des grilles Mesh 75 recouvertes d'une membrane de formvar.

Les grilles sont ensuite déposées sur une goutte d'une solution d'acétate d'uranyl à 1 % dans de l'eau bidistillée pendant 30 minutes à la température du laboratoire. Elles sont rincées à l'eau distillée

puis colorées de même pendant une minute sur une goutte de citrate de plomb (99). Rincées à nouveau elles sont examinées au microscope Siemens Elmiskop I. Les photographies sont prises sur plaques Scientia (Agfa-Gevaert), développées dans du révélateur Multiflex de Guillemillot et fixées au fixateur Radio de Kodak.

D. TECHNIQUES DE MICROCHIRURGIE

1. Micro-instruments.

Les deux micro-instruments dont nous nous servons : Crochet de contention sans ergot et micro-aiguille à pointe cassée, sont fabriqués à la microforge de Fonbrune et selon la technique de cet auteur (45).

2. Préparation de la chambre à huile .

Pour toutes les interventions microchirurgicales, nous utilisons la chambre à huile de Fonbrune (27). Pour diverses raisons, nous avons été amenés à remplacer l'huile de paraffine par de l'huile de silicone (S.I. 200 ou S.I. 750 de la société industrielle des silicones) (81).

Pour le reste, la technique que nous employons est celle de Fonbrune tant pour le montage de la chambre que pour le prélèvement des amibes après intervention.

3. Culture des amibes après intervention.

Une fois retirée de la chambre à huile, chaque amibe est mise individuellement sur la gélose d'une boîte de culture. Elle est repérée par un cercle tracé sur la boîte de Pétri. Afin d'éviter tout risque de confusion entre les amibes, nous ne mettons pas plus de quatre ou cinq amibes par boîte de culture.

4. Micromanipulateurs.

Le crochet de contention est monté sur un micromanipulateur mécanique Leitz. La micro-aiguille sur un micromanipulateur de Fonbrune. Les deux micromanipulateurs sont placés côte à côte à la droite du microscope.

5. Interventions microchirurgicales.

a) *L'énucléation* qui permet d'obtenir un cytoplasme d'amibe sans noyau (Amibes 1 C) est faite selon la technique de Comandon et Fonbrune (28).

b) *La greffe* d'un ou plusieurs noyaux supplémentaires a également été pratiquée selon la technique de ces auteurs (29). Elle a été faite selon deux modalités différentes en fonction du but poursuivi : ou bien les noyaux greffés sont pris à n'importe quel stade de leur évolution dans n'importe quelle amibe (dans ces conditions la greffe est aisée et réussit dans 100 % des cas) ou bien, lorsque nous avons voulu étudier la croissance d'amibes à 2 noyaux pour un cytoplasme ($2N + 1C$) la greffe a été faite dans des conditions bien particulières : elle est pratiquée juste après la mitose entre les deux cellules filles. La cellule $2N + 1C$ se trouve ainsi avec deux noyaux au même stade et à patrimoine génétique identique, avec un cytoplasme strictement semblable à celui d'une amibe normale au tout début de sa croissance. La greffe est pratiquée le plus tôt possible après la mitose pour deux raisons : 1° pour pouvoir mesurer le volume initial de l'amibe ; 2° pour avoir deux noyaux aussi semblables que possible.

Il faut noter que, comme cela a déjà été décrit pour d'autres amibes (91), la membrane nucléaire est extrêmement fragile juste après la mitose, rendant toute greffe pratiquement impossible. Nous avons donc été obligés d'attendre une demi-heure à une heure après la mitose pour effectuer les greffes. Dans cette période intermédiaire, les amibes sont placées dans une boîte de culture.

Malgré cette attente, il arrive fréquemment que la micro-aiguille transperce la membrane nucléaire et que, de ce fait, le noyau greffé altéré soit lysé. A cause de ces traumatismes, environ 75 % des greffes échouent. C'est donc sur les 25 % restants que sont effectuées nos mesures.

Il faut remarquer que l'on est tout à fait certain de l'intégrité des noyaux qui subsistent car, 1°) la moindre lésion de la membrane entraîne leur lyse ; 2°) le noyau greffé ne peut pas être distingué du noyau normal de l'amibe, même en microscopie électronique ; 3°) les deux noyaux vont se diviser ensemble de façon parfaitement normale.

c) *Obtention d'amibes $1N + 2C$* . Pour obtenir une amibe en début de croissance possédant un noyau et deux cytoplasmes, nous procédons de la façon suivante : On prélève une amibe normale en mitose dont les deux noyaux sont déjà séparés, mais dont la cytodiérèse est à peine commencée. A l'aide d'une micro-aiguille on enlève l'un des deux noyaux de cette amibe. Cette manœuvre arrête la cytodiérèse et nous obtenons bien une amibe « jeune » possédant un noyau « jeune » dans deux cytoplasmes « jeunes ».

d) *Obtention d'amibes $2N + 2C$* . Une amibe en mitose est prélevée et montée dans une chambre à huile comme dans le cas précédent. Avec la micro-aiguille on pénètre dans la cellule, on accroche l'un des deux noyaux et on le pousse à l'intérieur du cytoplasme pour l'amener à côté de l'autre noyau. Cette manœuvre bloque également la cytodiérèse, mais on a cette fois deux noyaux jeunes dans les deux cytoplasmes de cette amibe.

E. TECHNIQUES D'AUTORADIOGRAPHIE

1. Marquage.

Nous avons utilisé de la Thymidine ^3H marquée en position 6, dont l'activité spécifique est de 5 Ci/mM, diluée dans de l'eau distillée.

Pour des raisons indépendantes de notre volonté, nous avons été amenés à employer successivement de la Thymidine provenant d'Amer-sham (Angleterre), de Mol (Belgique), du Commissariat à l'énergie atomique (France). Des expériences témoins ont été faites avec chacune de ces Thymidines de façon à vérifier que leur comportement était bien le même dans nos conditions d'utilisation.

Vingt amibes sont placées dans une boîte de culture. 150 μ Ci de Thymidine ^3H sont dilués dans 0,75 ml d'eau distillée. Les amibes sont recouvertes avec 0,25 ml de cette solution soit 50 μ Ci une première fois. Seize heures plus tard elles reçoivent de même 50 μ Ci et à nouveau 50 μ Ci huit heures après. Le fractionnement des doses est imposé par le fait que les amibes ne se nourrissent pas en milieu liquide et que la gélose sur laquelle elles sont cultivées ne doit pas être trop humide.

Les amibes sont laissées dans cette boîte de culture entre 72 et 88 heures. Celles qui serviront de témoins pour le marquage sont alors fixées et préparées pour l'autoradiographie. Les autres sont soumises à un lavage par la Thymidine froide : prélevées dans la boîte de culture au bout de 72 heures elles sont placées dans une autre boîte de Pétri contenant seulement de la gélose.

A l'endroit où seront mises les amibes, on verse une solution de 0,85 mg de Thymidine froide dans 0,5 ml d'eau distillée. Au bout d'un quart d'heure, on dépose les amibes et on les recouvre avec une quantité identique de la même solution.

Elles demeurent ainsi pendant seize heures. Au terme de ce délai, elles sont prélevées et introduites dans une goutte d'eau distillée contenant 1,7 mg de Thymidine froide. Elles restent dans cette goutte une demi-heure à une heure à 4° C.

Elles sont ensuite soumises aux diverses expériences ou utilisées comme témoins et fixées.

2. Greffes nucléaires.

Des noyaux d'amibes marquées, lavées ou non à la Thymidine froide sont greffés dans des amibes normales. Ces amibes sont fixées soit immédiatement après la greffe, soit à des instants échelonnés après la greffe : 30 minutes, 2 heures, 18 heures et 24 heures, soit après la mitose de l'amibe.

3. Expériences témoins.

Lors de chaque expérience, des amibes normales ont été fixées pour connaître le bruit de fond.

De même des amibes entièrement marquées, avec ou sans lavage

par la Thymidine froide, ont été coupées chaque fois pour vérifier la qualité du marquage d'une expérience à l'autre.

Ont été également soumises à l'autoradiographie un certain nombre d'amibes pour vérifier l'absence de marquage parasite :

- 1° des amibes normales restées au contact d'amibes marquées,
- 2° des amibes normales greffées avec un noyau marqué que l'on enlève quelques minutes plus tard.

Enfin, pour éliminer le marquage des vacuoles digestives, dû aux bactéries, nous avons laissé séjourner une semaine des amibes dans une solution concentrée de pénicilline, colimycine, avant de les marquer.

En outre pour être certains que notre lavage par la Thymidine froide était efficace, nous avons effectué une fois un lavage d'une semaine des amibes dans une solution de Thymidine froide à environ 17 mg/ml.

4. Fixation et inclusion.

La fixation des amibes est exactement identique à celle que nous avons signalée plus haut pour la microscopie électronique. L'inclusion se fait de même en epon.

5. Confection des coupes et dépose de l'émulsion photographique.

Une fois la pyramide taillée, les amibes sont coupées à sec, sur un microtome de Porter-Blum, en coupes de 3 microns d'épaisseur environ. A l'aide d'une pince, on saisit les coupes sur le couteau et on les dépose à la surface d'une goutte d'eau distillée, sur une lame.

Après évaporation sur une plaque chaude, les lames sont trempées dans l'émulsion K₅ de Illford et séchées.

Elles sont ensuite laissées à 4° C pendant trois semaines puis développées dans du révélateur D 19 B de chez Kodak.

6. Coloration et examen des coupes.

Une fois les lames développées, les coupes sont colorées au bleu de méthylène et examinées au microscope à fort grossissement ($\times 1250$). Toutes les coupes passant par un noyau sont photographiées.

III. ETUDE CYTOLOGIQUE DE LA THECAMOEBA SHAERONUCLEOLUS

Comme nous l'avons déjà souligné, l'amibe que nous avons choisie comme matériel expérimental, a été très peu étudiée. Il importait donc avant toute expérimentation d'essayer de définir plus précisément sa morphologie, son mode de vie et sa place dans la classification.

En étudiant les quelques articles qui lui ont été consacrés, on se rend compte qu'il existe de nombreuses ambiguïtés dont la moindre n'est pas la définition même de l'espèce.

Si l'on se reporte à la première description de Greeff en 1866 (50) on note trois espèces différentes qui peuvent correspondre à l'amibe que nous étudions : l'une est innommée, les deux autres sont *Amoeba gracilis* et *Amoeba granifera*. En 1891 (51), le même auteur regroupe ces trois espèces en une seule à laquelle il donne le nom d'*Amoeba sphaeronucleolus*.

Pénard en 1905 (78) reprend les travaux de Greeff sans y ajouter d'éléments déterminants. Il change cependant la dénomination de l'espèce qui devient *Amoeba sphaeronucleolus*.

Grosse Allermann (54) puis Mattes (68), emploient eux aussi la dénomination de Pénard. Il en est de même pour Belar (2) qui en 1926 donne la première description précise de la mitose d'*Amoeba sphaeronucleolus*.

Sans que nous ayons pu en déterminer la raison, Péterfi et Naville en 1931, changent à nouveau le nom du protozoaire qui s'appelle désormais *Amoeba sphaeronucleolus* (80). C'est ce nom que vont adopter Comandon et Fonbrune (28 à 35).

La dernière étude cytologique que nous connaissons, est celle de Wittmann (97-98) qui reprend le terme de *Amoeba sphaeronucleolus*. Il en est de même pour L.-M. Hortsman (57 *bis*) dans sa récente étude de pharmacologie sur *Amoeba sphaeronucleolus*.

Ainsi, cette amibe, depuis sa découverte par Greeff, a porté un minimum de cinq noms différents dont deux restent encore en vigueur.

Quant à la place de l'*Amoeba sphaeronucleolus* dans la classification elle demeure, elle aussi, sujet de controverses. Si Greeff et Pénard en effet, la rangent sans hésitation dans la même famille qu'*Amoeba terricola*, Grassé dans son traité de Zoologie (49), la place sous la rubrique : « Plusieurs espèces d'amibes dont on ne sait à quelle famille les rapporter ».

Toutes ces imprécisions, sans insister sur les erreurs d'interpré-

tation qui se sont glissées dans les différents travaux, nous ont conduit à reprendre à l'aide des moyens modernes d'exploration (contraste de phase et microscopie électronique) l'examen de cette amibe que les anciens auteurs n'avaient pu observer qu'en fond clair.

I. MORPHOLOGIE DE L'AMOEBA SPHAERONUCLEOLUS EN INTERPHASE

A. ASPECT GENERAL DE L'AMIBE VIVANTE. FORMES, DIMENSIONS ET MOUVEMENT

La forme générale des amibes dépendant de leur vélocité, de leur état physiologique et du milieu où elles se trouvent, il est bon de préciser nos conditions d'observation.

Elles ont été examinées en fond clair et en contraste de phase soit directement sur la couche de gélose où elles sont cultivées, soit montées dans de l'eau distillée entre une lame et une lamelle séparées par un espace de 23,8 microns.

La première technique, à des grossissements ne pouvant dépasser 200 fois, ne permet que de se rendre compte de la forme générale de l'amibe en déplacement sur un milieu solide.

La deuxième technique autorise, par contre, une observation fine du cytoplasme et du noyau grâce à la compression ménagée qu'elle provoque. Mais elle change la forme de l'amibe qui, de calotte grossièrement sphérique, se transforme en un petit cylindre.

Lors de ses déplacements sur la gélose, l'amibe prend un aspect semblable à celui d'une « huître Belon » qui serait posée sur sa valve plate. Elle se déplace en formant un unique pseudopode ectoplasmique : large voile en avant, se rétrécissant en croissant vers l'arrière. Le noyau, les vacuoles digestives et la vacuole pulsatile sont alors généralement groupés à la partie postérieure de l'animal. Ils peuvent toutefois circuler plus ou moins en avant de leur position préférentielle. Il n'y a pas de collopode (fig. 2 et 3).

Observée entre lame et lamelle, il s'agit d'une cellule mononucléée (d'exceptionnels individus binucléés peuvent se rencontrer, surtout dans des cultures vieilles, de l'ordre de 1 pour 10 000 individus au moins (1)), mesurant en moyenne 140 microns de diamètre avec des valeurs extrêmes de 80 et 200 microns ; ce qui représente un volume moyen de 360 000 microns cubes, et des volumes extrêmes de 120 000 à 740 000 microns cubes environ.

Les courants cytoplasmiques sont assez lents (2 à 3 μ /s en moyenne);

(1) Il nous est arrivé une fois de trouver une amibe à 4 noyaux.

les granulations se déplacent vers le pseudopode assez régulièrement et les plus fines d'entre elles semblent se ranger en stries perpendiculaires à la membrane de l'amibe. Elles ne pénètrent jamais dans le hyaloplasme.

Lorsque l'amibe change de direction, les courants cytoplasmiques changent de sens, semblant pousser le hyaloplasme dans le nouveau sens de déplacement choisi.

Enfin, cette espèce ne s'enkyste jamais, se contentant de se dessécher sur place et pouvant se mouvoir à nouveau après humidification.

B. ETUDE DES CONSTITUANTS CYTOPLASMIQUES

1. Membrane cytoplasmique.

En microscopie photonique, tant en fond clair qu'en contraste de phase, elle apparaît comme une très fine limite de hyaloplasme. Pénard cependant (78) y a distingué « une pellicule bien plus fine et néanmoins plus tenace encore que celle de *Thecamoeba terricola* ». La présence de cette pellicule, suggérée par l'existence d'un double contour lorsqu'on examine la membrane à fort grossissement ($\times 1500$) est attestée par ses propriétés métachromatiques notamment au bleu de toluidine. Sa ténacité est facilement vérifiée par les expériences de microchirurgie.

Il faut signaler en outre que la membrane cytoplasmique présente constamment un plissement à la surface de l'amibe à l'état vivant. La direction de ces plis varie en fonction des mouvements cytoplasmiques sous jacents.

Enfin, comme l'avait déjà signalé Chambers, cette membrane possède une perméabilité sélective et orientée. La plupart des colorants vitaux ou néovitaux ne pénètrent pas dans la cellule, même si certains colorent la membrane. Le fait que l'amibe supporte parfaitement un séjour prolongé dans l'eau distillée, montre bien les propriétés particulières de son enveloppe (fig. 4).

En microscopie électronique, comme l'ont si bien décrit Fauré-Frémiet et André pour *Thecamoeba terricola* (43), cette membrane se compose d'une membrane unitaire d'épaisseur environ 80 Angströms, recouverte d'une couche de 200 Angströms finement fibrillaire. Cette couche externe vraisemblablement polysaccharidique laisse dépasser à sa surface des filaments relativement longs puisqu'ils mesurent environ 700 Angströms pour un diamètre approximatif de 20 Angströms; des filaments semblables ont d'ailleurs été décrits pour la membrane d'*Amoeba proteus* et pour celle de *Chaos Chaos* (8-9).

2. La lame ectoplasmique pseudopodiale.

Toujours étroite, ne dépassant pas 10 à 12 microns dans son développement maximum, elle ne laisse percevoir en microscopie photonique

qu'une substance fondamentale apparemment homogène. Son bord externe paraît lisse et ne montre aucune digitation ni indentation.

La microscopie électronique révèle une organisation beaucoup plus complexe : il existe de nombreux phénomènes de pinocytose et de micropinocytose. Par ailleurs, outre la « substance fondamentale », l'ectoplasme contient de multiples microfibrilles qui existent d'ailleurs dans tout le cytoplasme et sur lesquelles nous reviendrons. Il est également fréquent d'y rencontrer des granulations vraisemblablement constituées de glycogène. Par contre, les mitochondries et les autres inclusions de taille comparable, n'y pénètrent jamais.

3. Plasma pulsatile.

L'*Amoeba sphaeronucleolus* comporte un plasma pulsatile qui se distingue facilement en microscopie photonique. La vacuole pulsatile se forme par la croissance et la coalescence de vacuoles élémentaires comme cela est classique pour de nombreuses espèces d'amibes.

En dehors de quelques éléments de détail, nos observations coïncident parfaitement avec les descriptions minutieuses de Wittmann (97-98).

Si l'on examine la zone plasmatique où vient de disparaître la vacuole pulsatile juste après sa systole, on voit à cet emplacement se former et grossir de nouvelles vacuoles élémentaires qui vont confluer. Mais, ce qui est moins fréquent chez les autres amibes, c'est la fragmentation de ce plasma pulsatile : il peut y avoir des vacuoles élémentaires réparties dans tout le cytoplasme ; il peut y avoir coalescence de ces vacuoles en n'importe quel point du cytoplasme ; il est même possible de voir une vacuole se vider normalement de son contenu pendant qu'ailleurs, une autre vacuole de taille comparable est en train de se constituer.

Quels que soient ses déplacements et son éventuelle fragmentation au cours des mouvements de l'animal, la vacuole vient pratiquement toujours accomplir sa systole au même endroit : à la partie postérieure de l'amibe. Le canal d'excrétion est dirigé vers l'arrière et vers le bas, il débouche ainsi sur le sol où l'amibe est en train de cheminer.

En fin de diastole, la vacuole pulsatile atteint aisément un diamètre de 30 à 40 microns. Le rythme de ses contractions, lorsque l'amibe est placée dans l'eau distillée, est de *une* contraction toutes les 7 minutes en moyenne.

Au cours de la mitose, le plasma pulsatile cesse de fonctionner à partir de la fin de la prophase et les vacuoles restent où elles se trouvent à ce moment, jusqu'à la fin de la télophase. Ces vacuoles demeurent à l'endroit du cytoplasme « où les a surpris la mitose » jusqu'au moment où commence la cytodiérèse. Elles gagnent alors la région où s'effectue le partage cytoplasmique. La constriction progressive de la membrane sectionne lentement le plasma pulsatile en deux parties souvent très inégales qui se trouvent ainsi distribuées dans chacune des amibes filles.

Il est facile par des manœuvres microchirurgicales de maintenir la totalité du plasma pulsatile dans une seule amibe fille. L'autre amibe, initialement dépourvue, va reconstituer cet organe en un quart d'heure environ. Par ailleurs, si l'on essaye de faire pénétrer une micropipette dans la vacuole pulsatile, deux événements peuvent se produire : ou bien la vacuole pulsatile éclate et disparaît dans le cytoplasme sans laisser de traces (pour se reconstituer quelques minutes plus tard), ou bien l'on réussit à pénétrer à l'intérieur sans que le contenu de la vacuole ne soit modifié. Si l'on injecte à ce moment un liquide quelconque, on observe une augmentation du volume de la vacuole pulsatile.

En microscopie électronique, la région où sont situées les vacuoles pulsatiles élémentaires, est entourée d'une couche de mitochondries serrées les unes contre les autres. A l'intérieur de cette zone, on remarque la présence de plusieurs groupements vacuolaires : chacun présente en son centre une vacuole à double membrane, et celle-ci est entourée de multiples petites vacuoles semblables. Chaque groupement de vacuoles est grossièrement sphérique, donnant un aspect alvéolaire à la région cytoplasmique où se trouve la vacuole pulsatile.

4. Les vacuoles digestives.

Dans nos conditions de culture, très différentes de celles de Mattes (68) et Wittmann (97-98), la nourriture des amibes est composée de bactéries et de kystes de petites amibes.

Par un mécanisme que nous décrirons ultérieurement, l'amibe ingère d'un seul coup dans une grosse vacuole de phagocytose, une certaine quantité de germes microbiens. Cette vacuole initiale atteint fréquemment 40 microns de diamètre. Elle se situe, immédiatement après l'ingestion, dans le proche voisinage du noyau. La quantité de germes que contient la vacuole varie avec la richesse du milieu de culture. Il est fréquent d'observer plusieurs vacuoles de ce type dans une même amibe. Ces vacuoles se fragmentent ensuite en unités plus petites de taille variable, pouvant ne contenir que 2 ou 3 germes (fig. 5).

Il faut noter que cette évolution des vacuoles digestives est difficile à suivre, car, lorsqu'on examine les amibes dans de l'eau, elles ne tardent pas à déverser brutalement à l'extérieur, le contenu de leurs plus grosses vacuoles. Nous n'avons pas pu voir dans des amibes en culture, l'excrétion des vacuoles de déchets. Il s'agit vraisemblablement de vacuoles très petites.

Examinées au microscope électronique, ces vacuoles ont une membrane identique à la membrane cytoplasmique, ce qui est naturel étant donné leur mode de formation. Si l'amibe a été cultivée dans de bonnes conditions, elle contient une grosse vacuole, juxta-nucléaire, bourrée de germes.

Réparties dans le cytoplasme, d'autres vacuoles de taille variable contenant un nombre restreint d'éléments microbiens. Il est important de remarquer que ces germes sont à des stades de digestion extrême-

ment variés, certains n'existant qu'à titre de déchets quand d'autres paraissent parfaitement intacts.

Les vacuoles sont toujours entourées de nombreuses mitochondries.

Outre les vacuoles digestives proprement dites, dont le procédé de formation est très spécial, ces amibes sont capables de pinocytose sur toute la surface de leur membrane. Les vacuoles de pinocytose sont strictement identiques, quant à leur morphologie, aux vacuoles digestives, sauf qu'elles ne contiennent évidemment pas de germes.

5. Mitochondries et granulations.

Les mitochondries d'*Amoeba sphaeronucleolus* ne présentent pas de caractère particulier par rapport aux mitochondries de nombreux autres protistes; ce sont des mitochondries à tubes banales; elles mesurent environ 1 à 2 microns. Elles sont extrêmement nombreuses comme on peut le voir sur la planche n° 3. En contraste de phase, elles apparaissent comme de très petits grains noirs.

De taille comparable à celle des mitochondries, les granulations des amibes sont variables selon les souches isolées. Nous en avons observé deux types qui ne coexistent pas, semble-t-il, l'un avec l'autre. Les unes sont peu denses aux électrons, entourées d'une membrane simple, constituées d'un matériel granulaire très fin réparti dans toute la granulation et souvent arrangé en un paracristal au centre de celle-ci. Ce type de granulation correspond bien à la description morphologique des peroxyosomes telle qu'elle est donnée par Balduin (100) (fig. 6).

L'autre type est entouré d'une double membrane et contient un matériel non homogène composé d'une part, d'éléments semblables à ceux des granulations précédentes (bien qu'il n'y ait jamais de paracristal), d'autre part d'éléments plus grossiers et plus denses comparables aux ribosomes. Ces granulations comportent en outre des espaces clairs, apparemment vides, taillés à l'emporte pièce. Elles sont présentes en bien plus grand nombre dans le cytoplasme que les premières. En outre, elles entrent fréquemment en relation étroite avec les mitochondries (cf. photo n° 9 de la figure 26) qui peuvent les entourer plus ou moins complètement.

Nous n'avons observé aucune image permettant de penser que le contenu de ces granulations se déverse dans les vacuoles digestives.

6. Les corps de Golgi.

Comme chez *Amoeba proteus* (24), les corps de Golgi se présentent chez *Amoeba sphaeronucleolus* sous forme de dictyosomes comprenant chacun environ une douzaine de saccules superposés (fig. 7).

Ces dictyosomes sont très nombreux et répartis de façon variable dans le cytoplasme. Tantôt ils se groupent en amas de deux à dix, tantôt ils apparaissent complètement isolés, et cela chez la même amibe.

7. Ergastoplasme.

L'ergastoplasme de l'amibe est relativement peu abondant, comme cela a déjà été noté pour *A. proteus* (24); il apparaît sous forme de multiples petites vacuoles à parois lisses ou portant des ribosomes. Il est visible sur quelques unes des photographies précédentes. Il est réparti apparemment au hasard dans le cytoplasme.

8. Fibrilles.

Il existe de très nombreuses microfibrilles dans le cytoplasme de l'amibe. Elles sont toujours groupées en faisceaux plus ou moins larges qui peuvent bifurquer et s'entrecroiser. La répartition des fibres ne semble pas régulière, certaines régions cytoplasmiques étant plus riches que d'autres.

Elles sont très flexueuses car il est rare d'avoir sur une coupe des fibres dont la longueur dépasse 2 microns. Elles réapparaissent quelques microns plus loin. Elles sont comparables à celles de *Chaos Chaos* (71).

9. Inclusions et organites cytoplasmiques divers.

Il faut encore signaler dans le cytoplasme la présence : 1° de nombreux grains de glycogène répartis de façon homogène dans tout le cytoplasme, y compris le pseudopode ; 2° de nombreux ribosomes dont l'étude approfondie reste à faire.

Deux sortes d'inclusions méritent plus d'attention : les formations vermiculaires et de petites vacuoles à membrane double, entourées de ribosomes (fig. 8).

a) *Les formations vermiculaires.*

Il est fréquent de rencontrer dans certaines de nos cultures, des formations vermiculaires comme celle visible sur la planche n° 8. Ces formations ressemblent à celles décrites comme des réseaux viraux, formés par les nucleocapsides de virus hélicoïdaux (64). Si ce sont effectivement des virus, nous ne savons pas s'il s'agit de parasites normaux de l'amibe dans son milieu de vie naturel ou d'une contamination de culture. En tous cas, si virus il y a, ceux-ci ne semblent pas inhiber en quoi que ce soit la reproduction du rhizopode. Il faut signaler qu'une telle formation a été vue, une fois, dans le noyau même de l'amibe. De toutes façons des études complémentaires sont nécessaires dans ce domaine.

b) *Les vacuoles à membrane double.*

Lors de l'examen des coupes, on aperçoit un peu partout dans le cytoplasme de l'amibe, de petits éléments vacuolaires (1 500 Angströms). Ces éléments sont entourés de ribosomes, de façon extrêmement régulière. Fait plus surprenant, ces vacuoles possèdent deux membranes séparées par un espace de 200 Angströms, qui paraît rempli d'une

substance homogène. La fonction de ces vacuoles à membrane double, nous est inconnue, mais leur présence mérite d'être signalée.

10. Absence de centrosphère.

Il faut noter dès à présent, que nous n'avons jamais observé en microscopie photonique (fond clair, contraste de phase ou interférence) le moindre organite pouvant ressembler de près ou de loin, à une centrosphère, un aster, une « figure en araignée » ou toute autre formation pouvant témoigner de la présence d'un centriole.

En microscopie électronique, nous n'avons jamais vu non plus de formation semblable, mais le nombre de coupes que nous avons examinées est peut être trop faible pour que ce soit là un argument. Par contre, sur une coupe de la calotte nucléaire, nous avons observé une fois, une formation qui pourrait ressembler à une plaque atractophorienne, s'il ne s'agit pas d'un artefact.

C. ETUDE DU NOYAU EN INTERPHASE

Le noyau d'*Amoeba sphaeronucleolus* est un protocaryon pour autant que la classification de Chatton demeure valable (23). Il est arrondi ou légèrement ovalaire, son grand axe mesurant 20 à 25 microns et son petit axe 15 à 20 microns (fig. 9).

Le caryosome très réfringent et central, est presque parfaitement sphérique en interphase ; sa netteté est remarquable dès le premier examen et l'amibe lui doit son nom ; il est relativement volumineux (diamètre : 10 microns).

L'espace périsonien contient un suc nucléaire peu réfringent et homogène en microscopie photonique.

La membrane nucléaire est nette et très visible ; même en fond clair, elle semble avoir une certaine épaisseur. Les expériences de greffe nucléaire montrent d'ailleurs son exceptionnelle résistance.

Il faut noter enfin, que les colorations classiques du noyau sont pratiquement inutiles sur le noyau interphasique d'*Amoeba sphaeronucleolus*, où l'on ne peut obtenir aucune coloration du DNA (Feulgen, Vert de Méthyl-Pyronine). Ce phénomène est d'ailleurs connu chez d'autres amibes (87).

La microscopie électronique apporte ici beaucoup de précieux renseignements :

1. La membrane nucléaire (fig. 10 et 11).

Remarquons que le terme de membrane ne convient certainement pas pour désigner cette enveloppe nucléaire formée d'éléments qui, pour certains d'entre eux, n'ont rien à voir avec des membranes. Nous nous en tiendrons cependant à ce terme impropre mais consacré par l'usage chez *Amoeba proteus* (24-52-71-77-91).

En interphase cette membrane est très épaisse (0,5 micron environ) et se compose de couches successives de structure différente.

A la périphérie, une première couche composée de deux doubles membranes, alternativement séparées par un espace clair et réunies au niveau des pores nucléaires. La dimension des pores est constante et égale à environ 500 Angströms ; leur épaisseur de 250 Angströms. Ils sont régulièrement disposés et distants de 500 à 700 Angströms.

L'épaisseur totale de la couche superficielle entre les pores nucléaires (membrane double interne) est approximativement de 500 Angströms.

Une autre interprétation peut être donnée pour cette couche externe : Il y aurait une double membrane unique, recouverte de part et d'autre par une substance finement granulaire dont la structure plus dense en périphérie donnerait l'impression d'une membrane supplémentaire. Cette interprétation est d'autant plus vraisemblable qu'au moment de la mitose, lorsque la membrane se désagrège, on ne perçoit qu'une seule membrane double.

En dessous de cette couche périphérique, il existe une formation beaucoup plus épaisse (4 000 Angströms environ) qui constitue donc la quasi totalité de la membrane nucléaire. Si les amibes ont été fixées par l'acide osmique seul, cette structure apparaît homogène. Par contre, la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique, la révèle constituée de fibres entrelacées, ménageant en dessous des pores nucléaires des canaux qui se poursuivent jusqu'au nucléoplasme (fig. 12).

Un schéma représentatif de la « membrane nucléaire » permet mieux de voir la configuration de celle-ci dans l'espace. Cette configuration de la membrane, se rapproche de celle décrite par Pappas (77) puis par de nombreux auteurs chez *Amoeba proteus* (24-52-71-91). Cependant, si les deux couches superficielles et profondes, existent chez les deux espèces, la configuration de celles-ci est très différente d'une espèce à l'autre.

2. Le suc nucléaire.

La région située immédiatement à l'intérieur de la membrane et qui apparaît homogène en microscopie photonique, se révèle composée de plusieurs éléments, une substance peu dense aux électrons, de structure réticulaire, visible seulement aux forts grossissements, contenant des grains plus denses de petite taille (100 Angströms environ), souvent groupés en amas de taille variable. Ces grains sont parfois alignés, formant des sortes de « tubes » qui se trouvent au centre d'amas plus ou moins importants. Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer la nature de ces différents éléments (fig. 13).

3. Le caryosome.

Central et sphérique, le caryosome d'*Amoeba sphaeronucleolus*, apparaît extrêmement dense en microscopie électronique. Au faible

grossissement, sa structure semble homogène, exception faite de régions claires, qui apparaissent comme des « trous » dans le caryosome et dont le contenu se révèle identique à celui du suc nucléaire périphérique.

La structure du caryosome lui-même, en dehors de ces zones claires, est tout à fait semblable à celle d'un nucléole : on distingue aisément des granulations mesurant environ 150 Angströms réparties dans tout le caryosome. Une zone fibrillaire, étroitement mêlée à la précédente, est également visible quoique plus difficile à distinguer. En outre, il existe au sein de ce « caryosome » des alignements de granulations « en tubes » comme dans le suc nucléaire.

II. ETUDE DE LA MITOSE D'AMOEBA SPHAERONUCLEOLUS

Nous avons d'abord étudié la mitose d'*Amoeba sphaeronucleolus* en microscopie photonique ; cette étude avait déjà été faite par Wittmann (98) et Belar (2) notamment. Ces auteurs ne disposaient que de microscopes à fond clair et leurs études portaient sur des frottis ou des coupes optiques colorées. Seul Wittmann a pu suivre des mitoses à l'état vivant, en fond clair, mais il n'a pu observer que dans trois cas les transformations du noyau. Il n'est donc pas étonnant que l'examen de plus de cent mitoses en contraste de phase, apporte des renseignements nouveaux, et remette en cause l'interprétation de certaines observations antérieures.

Par la suite, nous avons complété ces observations par l'examen des principaux stades de la mitose en microscopie électronique.

Nous étudierons dans ce chapitre et la mitose proprement dite et la reconstitution du caryosome dans les noyaux des deux cellules-filles. Comme nous venons de le voir, la culture des amibes ne peut pas être parfaitement standardisée. Les durées du cycle mitotique que nous donnons, ne sont donc valables que dans les conditions de culture que nous utilisons sur des amibes isolées depuis plusieurs mois. Les temps donnés sont des moyennes établies sur environ six mois de culture.

A. MITOSE PROPREMENT DITE (fig. 14).

1. « Vacuolisation » du caryosome (1) (stade 2).

Le premier signe annonciateur de la mitose est l'apparition dans le caryosome de zones claires semblables à des trous. Ces « trous » naissent au centre du caryosome. Le plus souvent, ils sont petits,

(1) Nous appellerons stade 1 le noyau en interphase tel que nous l'avons décrit.

juxtaposés, ne confluant pas, donnant au caryosome un aspect mité. Parfois se forme un « trou » unique, beaucoup plus volumineux, donnant au caryosome un aspect d'anneau. Cet aspect en anneau peut aussi se voir lors de la reconstitution du caryosome après la mitose. Ce phénomène de « vacuolisation » a une durée beaucoup trop prolongée pour qu'il coïncide avec le début de la prophase : il dure en effet 18 heures environ. Mais ce phénomène est dans une telle continuité avec la prophase proprement dite, qu'il est difficile d'établir une limite nette.

Cette vacuolisation n'est pratiquement pas visible en fond clair. Elle est, bien entendu, plus précoce encore, si l'on examine le caryosome en microscopie électronique.

Dans ce cas, comme nous l'avons vu plus haut (p. 00), le caryosome présente à tous les stades de l'interphase des discontinuités circulaires où ne persiste aucune structure caryosomale et qui ne paraissent 'contenir que le « suc nucléaire ». Nous avons observé une fois un caryosome en anneau ; au centre de cet anneau subsistent seulement quelques travées de matériel caryosomal.

2. Apparition de filaments dans le suc nucléaire (stade 3).

Lorsque le caryosome est presque entièrement vacuolisé, de petits filaments ténus, noirs en contraste de phase, deviennent visibles dans le suc nucléaire. D'abord très peu nombreux et très fins, ils augmentent de nombre et de taille progressivement. Parfois, un de ces filaments revêt un aspect particulier : en forme de navette, ses bords sont frangés, comme constitués de petits fils à la limite de la visibilité. Ce stade d'apparition des filaments dure environ 4 heures. Pendant cette période, le caryosome continue à se vacuoliser.

3. La désagrégation du caryosome (stade 4).

Progressivement, à force de vacuolisation et d'apparition de filaments de plus en plus nombreux dans le nucléoplasme, le caryosome prend un aspect de réseau dont la périphérie apparaît encore un peu plus dense. Pendant toutes ces transformations, il augmente de taille et occupe à présent la quasi totalité du noyau. Ce réseau caryosomique devient rapidement de plus en plus ténu, il perd son contraste et semble se dissoudre totalement dans le suc nucléaire. Cette véritable dislocation du caryosome dure environ un quart d'heure.

Nous n'avons pas pu, à cause de sa brièveté (15 minutes) réussir à observer ce stade en microscopie électronique.

Jusque là, l'amibe apparaît parfaitement normale en culture, continuant à émettre son pseudopode et à se déplacer. Rien, en dehors de l'état de son noyau, ne peut laisser supposer que la mitose est imminente, sinon que l'amibe prend fréquemment en culture une forme arrondie dont les contours apparaissent noirs à la loupe binoculaire. Elle se remet ensuite en mouvement, largement étalée sur son support, et ses mouvements internes persistent tout à fait normalement.

4. Le noyau « vide » (stade 5).

Le caryosome paraît avoir entièrement disparu : en contraste de phase, le noyau apparaît comme un sac rempli de matière homogène et parfaitement transparent à la lumière. Les granulations cytoplasmiques se voient très nettement au travers de ce sac dont le contenu semble dépourvu de structure. Aussi avons nous donné à ce stade le nom de noyau vide. Wittmann (98) parle à ce propos de « Kernraum » en disant que le noyau lui-même n'est plus visible à ce stade. Etant donné la pauvreté de ses moyens d'observation, la durée (14 minutes) qu'il accorde à ce stade doit déborder sur les phases précédentes ou suivantes.

Il faut noter ici qu'il existe à ce point de la mitose, un changement important dans la physiologie de la cellule : si l'on prélève une amibe au stade du noyau vide et qu'on la place dans l'eau distillée, on bloque la mitose et l'on assiste à une réapparition du réseau caryosomique qui va se densifier de plus en plus. Si l'amibe est maintenue dans l'eau distillée, la mitose ne se produira pas. Si elle est remise sur son milieu de culture, il faudra attendre plusieurs heures avant que le caryosome ne se désagrège à nouveau et que la mitose ait lieu. Ce blocage de la mitose par l'eau se produit depuis la moitié du stade 4 jusqu'à la moitié du stade 5. Il est donc impossible d'observer dans l'eau le déroulement total de la mitose du début à la fin. Par contre, si l'on place l'amibe dans l'eau à partir de la deuxième moitié du stade 5, la suite de la mitose se déroulera normalement. Il est remarquable de noter que dans « l'eau d'aquarium », il ne semble pas exister un tel blocage puisqu'aucun des auteurs utilisant cette technique n'en parle.

Pendant ce stade du « noyau vide », les courants cytoplasmiques persistent, les bords du cytoplasme prennent un aspect festonné, presque frisé. Ce sont les Abkugelungspseudopodien de Wittmann. Le stade 5 dure environ 10 minutes.

En microscopie électronique, le « noyau vide » est extrêmement difficile à apercevoir sur les coupes car, aux faibles grossissements, sa texture apparaît semblable à celle du cytoplasme environnant. Une fois repéré, ses différents constituants ont une opacité aux électrons à peu près équivalente et se distinguent mal les uns des autres. Malgré ces difficultés, un certain nombre d'éléments se laissent percevoir (fig. 15).

a) *La membrane nucléaire.*

Comme le laissaient prévoir les images observées en microscopie optique, la membrane nucléaire persiste, mais ses éléments sont déjà altérés : la couche périphérique ne comporte pratiquement plus de pores. L'épaisseur de la membrane est de l'ordre de 300 Angströms (au lieu de 250 au niveau des pores et 500 entre les pores dans la membrane interphasique). Elle est dissociée de la couche interne qui a perdu son aspect fibrillaire et ne présente plus de canaux. Celle-ci apparaît maintenant constituée de grains très fins, son épaisseur a diminué : elle

est de l'ordre de 2 700 Angströms au lieu des 4 000 de la membrane en interphase.

Sous cette couche interne existe déjà une nouvelle membrane : celle des futurs noyaux. Elle n'occupe que deux des extrémités opposées du noyau où elle se trouve plaquée contre la couche interne de l'ancienne membrane, laissant libre le tiers médian du noyau. Elle se recourbe ensuite vers le centre du noyau prenant un aspect festonné. On retrouve çà et là des fragments de membrane comme on peut le voir sur le schéma ci-dessous. Cette membrane, d'une épaisseur de 250 Angströms environ comporte déjà des pores visibles tantôt de profil tantôt de face selon l'incidence de la coupe. Ces pores bien que moins nettement visibles apparaissent identiques à ceux de la membrane interphasique.

Le faible contraste et le peu de netteté des éléments nucléaires ne permettent pas de dire si la nouvelle membrane est continue, formant un sac fermé, ou si, comme cela est plus probable, la partie centrale de la membrane est encore absente, laissant une ouverture pour le passage ultérieur du fuseau et des chromosomes.

b) *Les microtubules.*

Très nombreux dans le nucleoplasme, groupés en faisceaux de quatre, ils sont orientés dans toutes les directions avec cependant une majorité parallèle à l'axe joignant les futurs noyaux. Il est fréquent d'observer des images qui peuvent laisser supposer un croisement de deux ou plusieurs faisceaux.

c) *Le nucléoplasme.*

Est composé de granulations de tailles diverses sans que nous ayons pu distinguer de structure particulière en son sein. Nous n'avons pas pu notamment percevoir de chromosomes.

Rappelons enfin que pas plus à ce stade qu'au stade suivant nous n'avons vu une structure quelconque pouvant rappeler un centriole.

5. Métaphase (stade 6).

a) *Microscopie photonique.*

Dans le noyau vide se rassemblent imperceptiblement de tout petits éléments, à la limite de la visibilité, qui gagnent progressivement le centre du noyau et vont constituer la plaque équatoriale. Petit à petit celle-ci finit par apparaître comme une très fine ligne sombre. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une plaque, car les chromosomes se disposent sur un anneau très fin dont le centre reste vide. La plupart du temps, cet anneau apparaît vu par la tranche et c'est seulement en faisant varier la mise au point que l'on s'aperçoit qu'il s'agit d'un anneau.

Par une observation très attentive, on peut distinguer deux zones dans le noyau : l'une très claire, située à la périphérie, large de 4 à 5 microns, l'autre légèrement plus opaque au centre. Il n'est pas possible

de savoir s'il s'agit d'un simple effet d'optique dû à la sphéricité du noyau ou à une structure réelle.

C'est seulement lors de la métaphase que les mouvements cytoplasmiques s'arrêtent et que l'amibe apparaît presque parfaitement circulaire. Elle a l'aspect en culture d'une petite calotte sphérique. Le stade 6 dure moins de 5 minutes.

b) *Microscopie électronique.*

La durée de la métaphase est si courte que nous n'avons pas pu saisir ce stade en microscopie électronique. Cela est d'autant plus regrettable qu'il s'agit du seul stade où les chromosomes de l'amibe sont à peu près caractérisés.

6. Séparation des chromosomes (stade 7).

a) *Microscopie photonique.*

Pendant tous les stades précédents, le noyau a progressivement augmenté de volume et, est demeuré sphérique. Il atteint maintenant son développement maximal. Dans ce noyau encore sphérique, les deux anneaux équatoriaux s'écartent progressivement l'un de l'autre. Il semble bien qu'il existe des fibres partant de ces anneaux, mais il est impossible de dire si leur extrémité s'attache à la membrane nucléaire ou au bord de la zone dense intranucléaire. Au fur et à mesure que les anneaux s'écartent l'un de l'autre, ils s'épaississent et les très fines granulations qui les constituaient ne se distinguent plus les unes des autres. Simultanément apparaît entre les deux anneaux chromosomiques un autre anneau unique, souvent décrit dans de nombreux types de mitose. Ce « corps intermédiaire » restera en position centrale, entre les chromosomes, jusqu'à la séparation des deux noyaux. Certains auteurs lui attribuent une richesse particulière en RNA que nous n'avons pas confirmée.

Les chromosomes continuent à s'écarter, le noyau devient ovalaire et les fibres interchromosomales sont de plus en plus nettement visibles. Les masses chromosomiques s'épaississent de plus en plus, de même que le corps intermédiaire.

L'allongement du noyau fait apparaître une concavité médiane où les fibres interchromosomales se rapprochent graduellement, tandis que le corps intermédiaire prend un aspect globuleux. Les masses chromosomiques s'incurvent et s'épaississent. L'ensemble de ces phénomènes dure un quart d'heure environ. C'est à la fin de ce stade que les noyaux deviennent parfaitement invisibles en fond clair. Les stades suivants sont donc jusqu'à présent, passés inaperçus ; sauf sur les préparations colorées qui prêtent comme nous allons le voir à discussion.

b) *Microscopie électronique.*

§ - Début de l'allongement du noyau.

La membrane nucléaire ancienne demeure telle que nous l'avons

décrite dans le « noyau vide ». La nouvelle membrane se referme très tôt sur les chromosomes des nouveaux noyaux. A peine l'ancien noyau a-t-il commencé à s'allonger qu'il existe déjà deux noyaux complètement enfermés dans leur nouvelle membrane. Cela rend d'autant plus difficile la dénomination des différentes phases de la mitose. En microscopie optique nous ne sommes qu'au tout début de l'anaphase alors qu'en électronique la télophase est presque consommée.

Entre les deux nouveaux noyaux il persiste un fuseau composé de faisceaux de microtubules parallèles entre eux. De tels faisceaux existent également à l'intérieur des noyaux. Nous n'avons pas pu distinguer où était leur extrémité.

La substance contenue dans les nouveaux noyaux apparaît identique à celle qui est située entre ces noyaux et l'ancienne enveloppe nucléaire, alors qu'en contraste de phase les nouvelles masses chromosomiques sont beaucoup plus contrastées que le matériel situé en périphérie.

§ - Fin de l'étirement du noyau (fig. 16).

Les noyaux fils sont toujours entourés de leur membrane qui est maintenant très contrastée. Elle ne comporte toujours que la couche externe de la membrane interphasique.

Le nucléoplasme revêt le même aspect qu'en interphase. De multiples petits nucléoles sont déjà présents et fusionnent rapidement les uns avec les autres.

L'ancienne membrane nucléaire est toujours présente, sa couche externe n'est guère modifiée, mais sa couche profonde se fragmente en différents amas souvent dissociés de la couche externe. Ces amas deviennent de plus en plus flous et finissent par s'effacer complètement.

Le corps intermédiaire apparaît comme une masse granulaire extrêmement dense, les grains qui le composent ont un diamètre de l'ordre de 180 Angströms. Il est traversé par l'ensemble des fibres du fuseau ce qui rend difficile une détermination précise de la structure fine de cet élément.

Les microtubules du fuseau sont encore bien plus visibles car ils sont maintenant groupés en amas plus importants (plusieurs centaines au centre du fuseau). Ils ne se trouvent plus qu'à l'extérieur des membranes des nouveaux noyaux. Là non plus nous n'avons pas pu déterminer où s'insérait leur extrémité.

En dehors de ces structures, il faut signaler la présence de nombreuses petites vacuoles situées entre les membranes de l'ancien et des nouveaux noyaux. Il n'est pas impossible qu'elles jouent un rôle dans la résorption de la couche profonde de l'ancienne membrane nucléaire.

7. La séparation des noyaux (stade 8).

Les deux masses nucléaires filles sont maintenant nettement visibles, reliées par des fibres de plus en plus coalescentes en apparence, et très amincies en leur milieu. Les lents courants cytoplasmiques, peuvent incurver ce « fuseau » extrêmement allongé. Le corps intermédiaire

n'est plus visible. On distingue encore très nettement l'ancienne membrane nucléaire qui est séparée de la zone chromosomique par une substance moins réfringente où l'on ne perçoit plus de structure fibrillaire.

Les noyaux continuent à s'éloigner l'un de l'autre et vont progressivement se placer tout contre la membrane cellulaire en deux points diamétralement opposés. Les fibres internucléaires s'étirent de plus en plus et deviennent bientôt invisibles en leur milieu, alors que leur point de départ sur les masses chromosomiques est encore nettement visible. Elles disparaissent bientôt complètement. Les masses chromosomiques sont alors arrondies et toujours situées à l'intérieur de l'ancienne membrane nucléaire. Celle-ci devient de moins en moins facile à distinguer. La durée de ces transformations est d'environ 25 minutes.

L'image si précise de la mitose que donne Belar (2) est donc erronée au moins sur un point : la séparation du fuseau et du noyau. Il s'agit vraisemblablement là, d'un artefact de préparation.

8. La cytodiérèse (stade 9).

Une fois les noyaux situés à proximité de la membrane cellulaire l'amibe commence à s'allonger, devenant ovalaire, puis perpendiculairement au « fuseau » apparaissent des encoches situées l'une en face de l'autre, et qui progressent vers le milieu de l'amibe. Il existe à ce stade des courants cytoplasmiques qui vont progressivement s'intensifier. Comme nous l'avons vu, la ou les vacuoles pulsatiles gagnent la région centrale. La progression du cloisonnement se fait de façon régulière, un courant cytoplasmique passant au travers du goulot d'étranglement tend à rendre la taille des deux amibes filles approximativement égale. La jonction des deux cloisons s'étant opérée, mais les amibes étant toujours liées, les mouvements actifs avec émission de pseudopodes reprennent immédiatement. Les pseudopodes sont opposés au point de jonction des deux amibes qui tendent donc à se séparer. Encore reliées par un filament, elles s'écartent l'une de l'autre d'une distance de 20 à 50 microns avant que le filament ne se rompe et qu'elles ne se retrouvent libres. La cytodiérèse dure environ un quart d'heure (fig. 17).

Nos observations coïncident donc avec celles si minutieuses de Wittmann sur les bourrelets de pression (Presswülste), les différentes catégories de pseudopodes et le filament de jonction (Teilungsfaden). Nous n'avons pas vu la rotation des pseudopodes qu'il décrit, mais cela tient peut-être à nos conditions d'observation.

B. RECONSTITUTION DU CARYOSOME

Nous avons laissé la masse chromosomique à l'état de masse dense homogène. Dès avant la cytodiérèse, de petits points noirs, à la limite

de la visibilité, apparaissent en son sein. Ces points très petits, grossissent et confluent de façon à former un réseau de mailles presque régulières, épaissies à leurs angles en mottes très contrastées. Ce stade est atteint, juste à la fin de la cytodierèse. La membrane de l'ancien noyau est encore visible à ce stade.

Certains des côtés des mailles se brisent de sorte qu'il ne reste que des groupes de deux ou trois mottes reliées par des filaments opaques donnant à chaque élément un aspect en haltères.

Ces haltères resserrent leurs extrémités formant une trentaine de gros points denses plus ou moins sphériques répartis dans le noyau. Certains d'entre eux sont situés contre la membrane et le noyau peut prendre alors, l'aspect d'un noyau de *Thecamoeba terricola*. Les granulations, d'un diamètre de 1 à 2 microns, fusionnent progressivement en grains plus gros et moins nombreux. Ces fusions se font de façon différente selon les amibes : l'aspect du caryosome peut ainsi prendre un aspect en fer à cheval, ou en anneau parfait, ou bien être constitué de granulations de plus en plus volumineuses et de moins en moins nombreuses.

Quoi qu'il en soit de la forme des fragments de caryosome en cours de reconstitution, ceux-ci finissent par reformer la sphère pleine quasi parfaite que nous avons décrite comme caryosome interphasique.

L'ensemble des phénomènes de reconstitution du caryosome dure 8 heures environ.

Il arrive fréquemment qu'un ou deux petits points denses demeurent indépendants de la sphère caryosomique jusqu'à la mitose suivante. Ces points sont toujours de dimension modeste, ne dépassant pas 3 microns.

La microscopie électronique n'apporte pas beaucoup de renseignements à ce stade : en effet, nous avons vu que les noyaux étaient déjà parfaitement reconstitués dès avant la cytodierèse. La fusion des caryosomes semble avoir lieu par simple rapprochement des masses nucléolaires. Aucune structure n'apparaît qui pourrait présider à ce rassemblement ; d'autre part, comme les caryosomes ne possèdent pas de paroi propre, la fusion n'est décelée que par la forme polycyclique d'un ou plusieurs éléments caryosomaux.

Le seul élément original apporté est la reconstruction d'une couche profonde fibrillaire sous la membrane superficielle des nouveaux noyaux. Cette couche ne commence à apparaître qu'après la cytodierèse, tout contre la membrane. Elle s'épaissit ensuite très progressivement vers le centre du noyau. Une demi-heure après la cytodierèse, son épaisseur n'est encore que de 540 Angströms. Sa synthèse ne se terminera que deux heures au moins après la cytodierèse. Nous n'avons aperçu aucune structure qui pourrait être rendue responsable de la synthèse de cette couche fibrillaire.

Il faut remarquer que les figures de Belar (2) sont bien plus exactes sur ce point que les descriptions de Mattes (68) et Wittmann (98). Ce dernier affirme notamment que les fragments de caryosome ne

sont jamais en nombre supérieur à 7. Cette conclusion vient évidemment de l'insuffisance de ses moyens d'observation.

Rappelons encore, que toutes les données de temps que nous avons fournies concernent des amibes cultivées par nous pendant une durée de plus de six mois. En effet, si l'on prend des amibes juste après leur isolement des mousses, leur taille est plus petite, comme nous le verrons plus loin, et leur cycle mitotique est beaucoup plus court que celui indiqué ici (37 heures). Il est d'environ 12 à 16 heures pour les premières générations et s'allonge rapidement au début, puis de plus en plus lentement, pour atteindre en culture stabilisée, la durée que nous avons indiquée.

Le cycle mitotique moyen indiqué par les courbes de Wittmann est encore plus long dans les conditions de culture qu'il utilise, puisqu'il est très proche de 48 heures.

III. CONDITIONS DE VIE EN MILIEU NATUREL ET EN CULTURE

Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, le milieu de vie privilégié de ces amibes dans la nature est constitué par les mousses poussant sur les vieux murs. Il est extrêmement difficile d'observer ces amibes dans leur milieu de vie naturel. Si Mattes (68) a pu décrire leur situation dans la partie aérienne des mousses, il semble que le sol autour des mousses soit plus riche encore. Tout ce que l'on peut dire c'est que, dans ces conditions naturelles elles se trouvent en présence de très nombreux micro-organismes qui, sans compter les bactéries et les champignons, comportent de nombreuses formes d'organisation : larves diverses, vers, protistes, notamment de multiples espèces d'amibes parmi lesquelles *Amoeba terricola* Greeff est la plus remarquable. Dans son milieu de vie, il semble que l'alimentation de l'*Amoeba sphaeronucleolus* soit des plus variée : outre de nombreuses vacuoles digestives bourrées de germes qu'il est difficile d'identifier, d'autres contiennent des kystes de petites amibes, d'autres encore des débris d'organismes pluricellulaires qu'il est également difficile de reconnaître.

Il faut encore indiquer que, comme de coutume (88), les amibes dans le sol ont une taille inférieure à celle qu'elles prennent en culture. Elles se situent toutes aux environs de la limite inférieure de taille que nous avons indiquée au début de ce travail (fig. 18).

Il est par contre plus facile d'en apprendre davantage sur les amibes en culture. L'observation directe à faible grossissement permet en effet d'apprécier le mode de nutrition de l'amibe :

La façon dont l'*Amoeba sphaeronucleolus* cultivée sur gélose absorbe ses proies, a déjà été observée par Comandon et Fonbrune : en avançant sur la gélose, le pseudopode de l'amibe décolle les germes

de leur support. Les germes progressent ensuite sur la face supérieure de l'amibe, d'avant en arrière, vers le sommet de celle-ci. Ce sommet se déprime alors en une vaste poche uniquement hyaloplasmique dénommée cheminée par Comandon et Fonbrune. Les germes ou l'amibe ingérée, viennent tomber dans la vacuole qui se referme lentement sur eux en englobant une bulle d'air.

Au moment où l'amibe forme sa cheminée, sa base devient circulaire et l'amibe perd en surface de base ce qu'elle gagne en hauteur. L'endoplasme est alors réduit au minimum et le noyau se trouve en dessous de la vacuole formée ou juste à côté de son fond.

Ce mode d'ingestion diffère considérablement de celui que Wittmann décrit (97). En effet, placée dans l'eau en présence d'oscillaires, l'amibe entoure ces filaments puis progresse le long de l'algue, enroulant celle-ci à l'intérieur de sa vacuole digestive. L'existence de deux modes de nutrition aussi différents est remarquable chez un organisme unicellulaire.

Une fois la digestion terminée, les vacuoles, comme nous l'avons vu, doivent être rejetées à l'extérieur. Il faut, à ce propos, signaler un élément important de la nutrition de cette amibe : il semble bien que certaines vacuoles digestives soient rejetées à l'extérieur, alors qu'elles contiennent des germes non digérés et parfaitement vivants. Cette hypothèse est étayée par le fait suivant : une amibe placée dans l'eau distillée pendant un temps prolongé, lavée dans plusieurs bains successifs, et remise en culture sur une gélose stérile, ensemence son nouveau milieu de culture avec des germes qui bientôt se développent en colonies. Tout se passe comme si l'amibe transportait en elle des germes destinés à ensemercer perpétuellement le milieu où elle vit. Jusqu'à présent, nous n'avons pas réussi à débarrasser les amibes de leurs germes, même en les plongeant dans un milieu riche en antibiotiques.

Nous n'avons donc pas pu envisager de les cultiver en milieu axénique. Cela entraîne forcément une certaine variabilité dans les conditions de culture, variabilité qui se répercute sur les phénomènes physiologiques de cet animal, notamment sur la durée du cycle mitotique.

IV. DIAGNOSE

La classification des amoebiens nus est encore très incomplète, et les critères de diagnose de ces rhizopodes souvent anciens et imprécis.

Nous pouvons donc, tout au plus, confronter les quelques observations que nous avons faites avec les anciennes descriptions, et essayer de dégager les caractères essentiels de cette espèce. Nous pourrions alors, dans une certaine mesure, tenter de la rapprocher d'espèces voisines.

1° *L'Amoeba sphaeronucleolus* s'est toujours vu attribuer, par les

différents auteurs, un habitat dans les mousses. Mattes (68) a même décrit avec une grande précision, son mode de vie en milieu naturel. Il n'est cependant pas possible à l'heure actuelle, de considérer cet habitat comme exclusif. Les deux modes de nutrition jusqu'à présent décrits chez cette amibe, pourraient au contraire laisser supposer, qu'elle s'adapte à une grande variété de circonstances géographiques. Il en est de même pour sa remarquable adaptation aux variations hygrométriques. Une certitude sur son habitat, ne pourra en fait être acquise, qu'après l'examen de nombreux sols.

2° Deux éléments importants ressortent cependant de cette analyse :

a) il s'agit d'une amibe dépourvue de collopode ;

b) elle ne forme pas de kyste, mais se dessèche sur place et reprend vie après humidification.

Ce deuxième caractère permet de la ranger dans le groupe des « amibes à pellicule ». Ce terme est d'ailleurs particulièrement mauvais puisque l'existence d'une membrane très voisine a été démontrée chez *Amoeba proteus* (24) et chez *Chaos Chaos* (8-9) en microscopie électronique. C'est donc bien l'absence de formation de kyste qui est un caractère différentiel et non la présence d'une pellicule.

3° Parmi les critères purement morphologiques, aucun n'est en soit décisif, mais tous peuvent être utiles. Nous retiendrons surtout la taille (80 à 200 microns), l'absence de cristal ou d'inclusion volumineuse cytoplasmique, et le caractère mononucléé pratiquement strict de cette espèce (quoique Mattes et Wittmann semblent avoir davantage d'individus binucléés dans leurs cultures). Le noyau arrondi avec caryosome rond central est également un élément de diagnose important. Peut-être faut-il accorder plus d'importance encore à la structure de la membrane nucléaire en microscopie électronique : jusqu'à présent, en effet, cette structure est très sensiblement différente de celle des autres espèces, il est vrai peu nombreuses, examinées en microscopie électronique.

4° Le point le plus délicat à aborder est, peut-être, la mitose : il était classique depuis Chatton (23) de ranger les divisions des amoébiens en 3 groupes : pro, méso, et métamitoses (49). Il semble bien que l'insuffisance des moyens d'observation ait fait commettre quelques abus dans ce domaine et que, de toutes façons, la mitose d'*Amoeba sphaeronucleolus* se refuse à entrer dans ce cadre.

Un certain nombre de phénomènes pourraient plaider en faveur d'une promitose : la membrane nucléaire persiste, il y a formation d'un anneau équatorial qui se dédouble et qui commence sa migration vers les pôles sans dédoublement du noyau, le noyau s'étire ensuite en haltère, la membrane nucléaire est résorbée au niveau du rétrécissement, il existe un « corps intermédiaire ».

Par contre, d'autres caractères spécifiques de la promitose n'existent pas : il n'y a pas d'allongement du caryosome, il n'y a pas non plus de corps polaires et donc pas de formation du fuseau entre de tels

corps, il n'existe pas de centriole, le caryosome disparaît complètement au cours de la mitose, le corps intermédiaire ne se coupe pas en deux et il n'est pas constitué par les chromosomes.

Voyons maintenant la mésomitose :

En sa faveur : la désintégration du caryosome, l'existence d'une « double brosse » fusoriale à partir de la plaque équatoriale.

Mais, le caryosome est compact, il n'existe pas de cercles polaires (pour autant que leur description ne soit pas celle d'un simple artefact), il y a un étirement considérable de la vésicule nucléaire, il n'y a pas de pseudo-corps polaires et pas de couche de pérismes se reconstituant le long de la membrane nucléaire.

La métamitose étant essentiellement définie par la présence d'un centrosome et l'*Amoeba sphaeronucleolus* ne comportant pas cet organite, il est clair que la mitose de cette amibe n'est pas de type métamitotique.

Il semble bien que ces classifications de mitoses reposent souvent sur des observations anciennes sur frottis ou coupes colorées, et que l'absence d'observation dynamique du phénomène et les colorations plus ou moins différenciées, aient amené à des conclusions erronées. L'obligation à laquelle Chatton a été réduit de parler de prométamitose rend bien compte de l'insuffisance ou de l'inexactitude d'une telle classification. Il est vraisemblable, que les théories naguère en vogue du nucléole centrosome ou du centriole d'origine nucléaire, n'ont pas été sans influencer les descriptions mitotiques d'autrefois. Nous nous contenterons donc de considérer la mitose d'*Amoeba sphaeronucleolus* telle qu'elle est, sans lui donner de place particulière, ni de nom particulier.

5° En dehors de la mitose proprement dite, l'un des caractères distinctifs de cette amibe, est le mode de reconstitution de son caryosome. Si ce caractère aide un diagnostic d'espèce dans une culture suivie de façon prolongée, il incite, au contraire, à l'erreur si l'on se contente d'observer l'amibe une seule fois. Une *Amoeba sphaeronucleolus* jeune, peut fort bien par exemple, être confondue avec une amibe de taille voisine dont le caryosome est normalement divisé en pérismes.

Pour nous résumer, l'*Amoeba sphaeronucleolus* est une amibe nue, mononucléée, mesurant de 80 à 200 microns, et ne formant pas de kyste. Elle est dépourvue de colopode, de cristaux et d'inclusions volumineuses, possède un noyau arrondi à caryosome rond central avec une membrane nucléaire particulière en microscopie électronique. La division de ce noyau se fait sans intervention de centrosome, à l'intérieur de la membrane nucléaire, après dislocation du caryosome. Ce dernier se reconstitue après la mitose par fusion progressive d'éléments plus petits.

Avec ces éléments, nous pouvons sans ambiguïté, classer l'*Amoeba sphaeronucleolus* dans le sous ordre des Amastigogenina. Les difficultés surgissent quand il s'agit de la placer dans un groupement plus précis.

Il semble bien qu'il faille la rapprocher des Thecamoebiens avec lesquels elle a en commun : l'habitat terricole dans les mousses, l'absence de kyste et la faculté de se dessécher pour revivre après humidification, le mode de nutrition par invagination cytoplasmique. Seule, la mitose ne correspond pas aux caractères de ce groupe qui se diviserait le plus souvent par métamitose. Mais nous avons vu la valeur très relative d'un tel argument. C'est pourquoi, pour notre part et dans l'état actuel de la classification des Amœbiens, il nous semble que cette espèce devrait porter le nom de *Thecamoeba sphaeronucleolus* (Greeff).

IV RELATIONS NUCLEO-CYTOPLASMIQUES

A. INFLUENCES RESPECTIVES DU NOYAU ET DU CYTOPLASME SUR LA CROISSANCE EN VOLUME ET SUR LA DUREE DE L'INTERPHASE

A la suite de nombreux auteurs qui ont étudié les relations nucléocytoplasmiques grâce à la microchirurgie (28 à 40, 44-47-48-86), nous nous sommes servi de cette technique pour étudier le rôle respectif du noyau et du cytoplasme dans la croissance en volume de *Thecamoeba sphaeronucleolus*. Nous avons exploré un système expérimental permettant de distinguer l'influence de chacun des deux constituants cellulaires : il suffit pour cela de séparer les deux paramètres et de faire varier la quantité de cytoplasme pour un nombre constant de noyaux et, inversement, de faire varier le nombre de noyaux pour une quantité fixe de cytoplasme. Partant d'une amibe normale qui comporte un noyau et un cytoplasme (1N + 1C) nous avons réalisé par les techniques de microchirurgie les systèmes suivants :

Deux noyaux et un cytoplasme (2N + 1C)

Un noyau et deux cytoplasmes (1N + 2C)

Deux noyaux et deux cytoplasmes (2N + 2C)

Nous avons vu plus haut les techniques qui nous permettent d'obtenir ces différentes variétés ainsi que les méthodes de mesure du volume cellulaire. Avant d'examiner les résultats des expériences, il nous faut encore insister sur deux points de technique particuliers.

a) *La fréquence des mesures de volume.*

Le volume des amibes est déterminé initialement juste après la mitose pour les amibes normales (1N + 1C), juste après l'intervention microchirurgicale pour les autres. L'instant auquel est pratiquée cette mesure est l'instant zéro ($t = 0$). Le volume est ensuite mesuré toutes les quatre heures, mais l'expérimentation cesse le soir à 17 heures et reprend le matin à 9 heures. L'instant $t = 0$ se situe soit à 9 heures du matin, soit à 13 heures, soit à 17 heures. Aussi, le tableau rassemblant toutes les mesures ne comporte-t-il pas le même nombre d'individus dans toutes les colonnes. Par exemple, lorsque $t = 0$ se situe à 17 heures, les points $t = 4$ h, $t = 8$ h, et $t = 12$ h manquent. Lorsque $t = 0$ se situe à 9 heures, il manque $t = 12$, 16, et 20 h. Dans tous les cas, les points $t = 12$ et $t = 16$ sont manquants .

Nous avons choisi une période de mesure de 4 heures parce que nous avons constaté qu'à fréquence plus élevée, le développement des

amibes est perturbé, comme le montre la comparaison avec une population d'amibes témoins qui ne sont pas soumises aux mesures.

Enfin, les mesures des amibes 2N + 1C, 1N + 2C et 2N + 2C ont été effectuées en même temps que des mesures d'amibes normales (1N + 1C) en nombre comparable. Cela est de la plus grande importance du fait des variations du volume et du cycle mitotique chez ces amibes dont les conditions de culture ne peuvent être normalisées.

b) *Les délais d'expérimentation.*

Les techniques de microchirurgie sont longues et complexes, aussi est-il impossible d'effectuer simultanément les mesures sur toutes les séries expérimentales. Nous avons effectué une première série de mesures sur des amibes normales (1N + 1C) et des amibes greffées (2N + 1C). Une fois cette première série terminée, une deuxième a été entreprise (6 mois plus tard) comportant à nouveau des amibes normales et, cette fois, des amibes 1N + 2C et 2N + 2C.

Comme les cultures ne sont pas parfaitement stables, les résultats pour les deux séries d'amibes normales diffèrent nettement. Nous verrons plus loin comment il est possible de comparer entre elles les deux séries.

1. Mesure de la croissance des amibes normales.

52 amibes ont été mesurées dans la première série expérimentale (série N₁) et 52 également dans la deuxième (série N₂). Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau suivant :

Série N ₁	Heures	0	4	8	24	28	32
	Volume en milliers de μ^3	269	308	336	477	496,5	481,5
	Nombre d'amibes mesurées	45	52	44	49	44	35
	Intervalle de confiance 95 %	$\pm 10,5$	$\pm 13,4$	$\pm 15,6$	± 22	$\pm 23,4$	$\pm 28,1$

Série N ₂	Heures	0	4	8	24	28	32
	Volume en milliers de μ^3	140	144,5	163,9	243	254	275
	Nombre d'amibes mesurées	52	49	50	32	15	8
	Intervalle de confiance 95 %	± 5	± 6	$\pm 6,6$	$\pm 10,6$	$\pm 10,7$	$\pm 23,5$

2. Mesure de la croissance des amibes greffées (2N + 1C).

44 amibes greffées ont été mesurées. La moyenne des volumes aux différentes heures est donnée par le tableau suivant :

Heures	0	4	8	20	24	28
Volume en milliers de μ^3	304	294	357,5	503	547	581
Nombre d'amibes mesurées	22	35	13	28	44	36
Intervalle de confiance 95 %	$\pm 17,1$	$\pm 13,7$	$\pm 25,7$	$\pm 26,7$	± 27	$\pm 32,6$

Heures	32	44	48	52	56	
Volume en milliers de μ^3	607	773	830	821,5	847,5	
Nombre d'amibes mesurées	15	20	35	25	9	
Intervalle de confiance 95 %	$\pm 50,3$	$\pm 44,7$	$\pm 44,8$	$\pm 49,8$	$\pm 89,8$	

Les chiffres, comme nous l'avons dit, doivent être comparés avec ceux des amibes normales de la série N₁.

3. Mesure de la croissance des amibes (1N + 2C) et (2N + 2C).

Le volume des amibes de ces deux variétés a été mesuré en même temps que celui des amibes normales de la série N₂ qui a donc servi de référence. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-après.

Amibes 1 N + 2 C	Heures	0	4	8	16	20	24	28
	Volume en milliers de μ^3	238	264,3	303,1	370,6	366	376,6	
	Nombre d'amibes mesurées	63	30	32	17	5	9	
	Intervalle de confiance 95 %	$\pm 6,9$	$\pm 11,6$	$\pm 12,9$	$\pm 20,2$	$\pm 42,2$	$\pm 24,8$	
Amibes 2 N + 2 C	Heures	0	4	8	16	20	24	28
	Volume en milliers de μ^3	255	296	318	411	450	477	477
	Nombre d'amibes mesurées	61	39	14	21	31	29	12
	Intervalle de confiance 95 %	± 8	± 11	± 21	± 28	± 21	± 23	± 28

4. Volume prémitotique.

Si nous traçons les courbes donnant le volume V moyen des amibes d'une série, en fonction de la durée t moyenne de leur croissance, deux remarques s'imposent : 1) La croissance des amibes de chaque série est pratiquement linéaire. 2) La pente des courbes diminue à leur extrémité. Cela s'explique par le fait que les amibes les plus volumineuses se divisent les premières ; ces amibes n'étant plus mesurées, la moyenne des mesures n'est faite que sur les amibes les plus petites. Il s'ensuit évidemment une diminution de la pente.

Pour mieux représenter la croissance des amibes, nous avons utilisé un segment de droite dont l'origine est le volume moyen des amibes à l'instant zéro, et dont l'extrémité est le volume des amibes lors de la dernière mesure précédant la mitose, volume ramené à l'instant moyen de mitose. Dans la première série expérimentale, le volume prémitotique ainsi défini est légèrement inférieur à la réalité. En effet, dans cette série, la dernière mesure précédant la mitose peut avoir eu lieu plusieurs heures avant la division cellulaire. Dans notre deuxième série expérimentale, nous avons pallié ce défaut en mesurant le volume de 30 amibes au moins de chaque sorte au moment de la prophase ou de la métaphase. L'instant moyen de mitose est établi sur

l'ensemble de toutes les amibes mesurées. Nous obtenons ainsi un tableau résumé de toutes nos mesures.

		Volume moyen à l'instant zéro	Volume prémitotique moyen	Instant moyen de mitose
Première série expéri- mentale	Amibes 1 N + 1 C Série N ₁	269 ± 10,5	498,8 ± 24,4	37
	Amibes 2 N + 1 C	304 ± 17,1	851,1 ± 40,3	57,30
Deuxième série expéri- mentale	Amibes 1 N + 1 C Série N ₂	140 ± 5	262,5 ± 23,5	26,46
	Amibes 1 N + 2 C	238 ± 6,9	363,2 ± 17,2	18
	Amibes 2 N + 2 C	255 ± 8	480 ± 20	23,55

Nous pouvons maintenant tracer les courbes obtenues dans les deux séries expérimentales et les droites correspondantes, avec pour origine le volume moyen à l'instant zéro et pour extrémité le volume prémitotique moyen à l'instant moyen de la mitose (fig. 19 et 20).

5. Comparaison des deux séries expérimentales.

Devant le tableau des résultats, se pose la question de la validité d'une comparaison entre les deux séries expérimentales.

Nous sommes en présence de deux séries d'amibes normales dont les volumes sont très différents et dont les instants de mitose sont très éloignés. Ces différences, nous l'avons dit, sont dues aux conditions de culture. A priori, le rôle du noyau et du cytoplasme ne sont pas différents d'un cas à l'autre. Il existe une méthode simple pour vérifier cette hypothèse : il suffit de ramener, par affinité mathématique, l'origine des deux droites représentatives au même point et de ramener le temps de mitose des deux séries au même instant. Cela ne change en rien la courbe représentative car il s'agit d'un simple changement d'unités.

Pour que les deux origines soient confondues, il suffit de multiplier le volume initial des amibes de la série N₁ par le rapport des volumes initiaux des deux séries :

$$V'_o = V_o \times \frac{V_2 \cdot o}{V_o} \tag{1}$$

$$\text{soit} \quad V'_o = 269 \times \frac{140}{269} = 140 \quad (2)$$

De même pour le temps de mitose :

$$T'_m = T_m \frac{T_{2m}}{T_m}$$

$$\text{soit} \quad T'_m = 37 \times \frac{26,77}{37} = 26,77 = 26 \text{ h } 46 \text{ mn} \quad (3)$$

Ces deux transformations n'ont changé ni la pente ni le volume final des amibes de la série N_1 .

Pour vérifier si la croissance est bien la même dans la série N_1 et dans la série N_2 , il suffit d'appliquer l'affinité (2) au volume prémitotique de la série N_1 . De deux choses l'une ou bien le volume prémitotique transformé sera le même que celui de la série N_2 , et cela nous autorisera à comparer les deux séries expérimentales ; ou bien le volume prémitotique de N_1 transformé sera différent du volume prémitotique de N_2 , et nous n'aurons pas le droit de comparer car cela voudra dire que le rôle respectif du noyau et du cytoplasme d'une expérience à l'autre a varié.

Le volume prémitotique N_1 est de 498,8 milliers de microns-cubes ($V_m = 498,8$). Le volume prémitotique transformé sera donc :

$$V'_m = 498,8 \times \frac{140}{269} = 259,4$$

Le volume prémitotique des amibes N_2 est de 262,5, soit une erreur de 1,5 %, erreur largement inférieure à la précision des mesures. Nous sommes donc autorisés à effectuer la transformation et à transformer selon le même rapport l'autre courbe de cette série expérimentale (amibes $2N + 1C$). Cette deuxième transformation découle de la première, elle ne fait que conserver les rapports existants entre les courbes avant toute transformation.

Nous obtenons comme volume initial des amibes $2N + 1C$:

$$V'_o = 304 \times \frac{140}{269} = 158,1$$

et comme volume prémitotique

$$V'_m = 851,1 \times \frac{140}{269} = 442,6$$

Le temps moyen de mitose devient :

$$T'_m = 57,5 \times \frac{26,77}{37} = 41,57 = 41 \text{ h } 34 \text{ mn}$$

Nous pouvons ainsi donner un tableau unique de valeurs toutes comparables entre elles.

	Volume moyen à l'instant zéro	Volume prémitotique moyen	Instant moyen de mitose
Amibes 1 N + 1 C			
Série N 1	140	259,4	26 h 46 mn
Série N 2	140	262,5	26 h 46 mn
Amibes 2 N + 1 C	158,1	442,6	41 h 34 mn
Amibes 1 N + 2 C	238	363,2	18 h
Amibes 2 N + 2 C	255	480	23 h 55 mn

Nous n'avons pas indiqué les intervalles de confiance ; en effet, nous leur conserverons la valeur qui a été indiquée dans les tableaux précédents. Nous pouvons maintenant tracer sur le même graphique les droites de toutes les séries (il nous a paru inutile de transformer les courbes expérimentales point par point puisque, comme nous l'avons vu, les droites représentent de façon plus satisfaisante la croissance des amibes) (fig. 21).

Il ne reste plus maintenant qu'à tirer les conclusions des différences entre les courbes représentatives. Pour cela, il est commode de calculer les valeurs suivantes :

1) La croissance en volume des amibes qui est égale au volume prémitotique auquel est retranché le volume initial de l'amibe :

$$\Delta C = V_p - V_i$$

2) La longévité (L) qui est indiquée par l'instant moyen de mitose ;

3) La rapidité de croissance représentée par la pente de la droite

$$P = \frac{\Delta C}{L}$$

Enfin, pour comparer plus facilement les chiffres, nous ferons le rapport des valeurs trouvées dans chaque cas à celles trouvées pour l'amibe normale.

Cela nous donne le tableau suivant :

	Amibes normales (1 N + 1 C)		Amibes 2 N + 1 C	
	Données	Rapport	Données	Rapport
Augmentation de volume $\Delta C = V_p - V_i$ en milliers de μ^3	262,5 — 140	1	442,6 — 158,1	2,2
	122,5		284,5	
Longévité en heures L	26,76	1	41,57	1,5
Pente $P = \frac{\Delta C}{L}$ en milliers de μ^3 par heure	$\frac{122,5}{26,76} = 4,59$	1	$\frac{284,5}{41,57} = 6,84$	1,5

	Amibes 1 N + 2 C		Amibes 2 N + 2 C	
	Données	Rapport	Données	Rapport
Augmentation de volume $\Delta C = V_p - V_i$ en milliers de μ^3	363,2 — 238	1,0	480 — 255	1,8
	125,2		225	
Longévité en heures L	18	0,67	23,92	0,9
Pente $P = \frac{\Delta C}{L}$ en milliers de μ^3 par heure	$\frac{125,2}{18} = 6,95$	1,5	$\frac{225}{23,92} = 9,40$	2,0

6. Discussion.

Dans le tableau précédent, nous voyons que sur les trois valeurs calculées (ΔC , L et P), deux seulement sont indépendantes, la pente n'étant qu'un quotient des deux premières. Il suffit donc d'étudier la croissance en volume et la longévité pour tenter de donner une signification à la pente.

1. Croissance en volume.

Pour mieux nous représenter cette variable, établissons un histogramme en classant chaque série d'amibes selon son rapport avec la normale (fig. 22).

Il apparaît à la seule vue de cette représentation graphique que les amibes possédant un seul noyau ont une croissance en volume identique. Celles qui possèdent deux noyaux ont une croissance en volume double des précédentes (aux erreurs de mesure près). Il semble donc que la

croissance en volume qui représente essentiellement la croissance du cytoplasme ne soit dépendante que du noyau. En effet, quelle que soit sa quantité initiale de cytoplasme, une amibe à deux noyaux augmentera deux fois plus de volume qu'une amibe à un seul noyau. L'interprétation de cette dépendance nucléaire exclusive en apparence reste à faire. Nous essayerons de voir à quoi elle peut correspondre lorsque nous aurons examiné l'autre variable.

2. Longévité.

Procédons de façon identique et traçons l'histogramme représentatif de la longévité par rapport à la normale (fig. 23) .

Cette fois, il n'apparaît pas à l'évidence de corrélation entre cet histogramme et le nombre de noyaux ou de cytoplasmes. Nous remarquons cependant que ces différentes valeurs varient dans le même sens que le rapport nucléo-cytoplasmique. Essayons donc d'évaluer les rapports N/C du volume du noyau à celui du cytoplasme dans les différents types d'amibes.

Appelons x le volume initial d'un noyau d'amibe. Tous les noyaux étant identiques au départ nous auront la même valeur x pour un noyau dans toutes les séries.

Appelons y le volume final d'un noyau d'amibe juste avant la mitose. Cette fois il n'est pas forcément identique pour toutes les amibes et il est nécessaire de vérifier expérimentalement l'hypothèse suivante : le volume final y est le même pour toutes les séries d'amibes. Nous avons mesuré ces noyaux et ils ne montrent pas de différence entre eux compte tenu des erreurs effectuées sur les mesures. Nous avons donc les rapports nucléo-cytoplasmiques suivants :

	Amibes normales (1 N + 1 C)	Amibes 1 N + 2 C	Amibes 2 N + 2 C	Amibes 2 N + 1 C
Rapport $\frac{N}{C}$ initial	$\frac{x}{140}$	$\frac{x}{238}$	$\frac{2 x}{255}$	$\frac{2 x}{158,1}$
Rapport $\frac{N}{C}$ final	$\frac{y}{262,5}$	$\frac{y}{363,2}$	$\frac{2 y}{480}$	$\frac{2 y}{442,6}$
Rapport $\frac{N}{C}$ moyen	$\frac{x + y}{140 + 262,5}$	$\frac{x + y}{238 + 363,2}$	$\frac{2 (x + y)}{255 + 480}$	$\frac{2 (x + y)}{158,1 + 442,6}$

Selon la méthode qui nous est maintenant coutumière, ramenons la valeur du rapport N/C pour l'amibe normale à 1 et comparons lui le rapport des autres séries.

$$\begin{aligned} \text{Rapport } \frac{N}{C} \text{ de l'amibe normale} & \quad \frac{x+y}{140+262,5} \times \frac{140+262,5}{x+y} = 1 \\ \text{Rapport } \frac{N}{C} \text{ de l'amibe 1 N + 2 C} & \quad \frac{x+y}{238+363,2} \times \frac{140+262,5}{x+y} = 0,68 \\ \text{Rapport } \frac{N}{C} \text{ de l'amibe 2 N + 2 C} & \quad \frac{2(x+y)}{255+480} \times \frac{140+262,5}{x+y} = 1,1 \\ \text{Rapport } \frac{N}{C} \text{ de l'amibe 2 N + 1 C} & \quad \frac{2(x+y)}{158,1+442,6} \times \frac{140+262,5}{x+y} = 1,5 \end{aligned}$$

Traçons maintenant les histogrammes comparés de la longévité et du rapport nucléo-cytoplasmique (fig. 24) :

Nous voyons qu'aux erreurs de mesure près ces deux histogrammes sont superposables. Nous pouvons donc conclure que la longévité des amibes à un ou plusieurs noyaux varie exactement comme leur rapport nucléo-cytoplasmique.

3. Pente.

Il nous reste à tracer l'histogramme représentatif de la pente (fig. 25) :

Il n'y a pas là de corrélation particulière à établir puisque la pente ne représente que le quotient de la croissance en volume par la durée de l'interphase.

Interprétation.

Au terme de ces expériences, nous avons pu établir deux faits :

- 1) La croissance en volume de la *Thecamoeba sphaeronucleolus* ne dépend en apparence que du nombre de ses noyaux.
- 2) La durée de l'interphase de la *Thecamoeba sphaeronucleolus* varie comme son rapport nucléo-cytoplasmique.

Ces deux faits solidement établis peuvent appeler quelques remarques, mais il serait parfaitement illusoire de chercher à en tirer des précisions sur les mécanismes qui les produisent. Sachant que la croissance cytoplasmique ne dépend que du noyau, on peut penser que les différents organites cytoplasmiques sont synthétisés sous la dépendance directe ou indirecte du noyau et que c'est la fabrication du RNA nécessaire aux synthèses qui est en cause. En réalité, le fait que cette croissance ne dépende que du noyau peut provenir de quantité de causes si l'on considère que le noyau, dans nos conditions expérimentales est le facteur limitant la croissance et non le facteur unique de croissance. Cette limitation peut certes être une insuffisance de RNA messenger, mais elle peut concerner n'importe quelle série de réactions biochimiques nécessaires aux synthèses cytoplasmiques.

L'augmentation du nombre de noyaux peut entraîner de multiples conséquences depuis l'augmentation de l'absorption alimentaire jusqu'à

l'organisation des différentes structures cytoplasmiques. Avec l'appréciation globale de tous ces phénomènes que nous donne la mesure du volume, nous ne pouvons pas conclure avant d'en savoir plus long sur les réactions qui sont mises en jeu.

En ce qui concerne la durée de l'interphase le fait qu'elle varie comme le rapport nucléo-cytoplasmique entraîne plusieurs remarques :

1) Cela ne veut pas dire que le rapport nucléo-cytoplasmique est constant d'une série à l'autre ; bien au contraire, nous avons vu qu'il variait dans des rapports de $2/3$ à $3/2$. Cela veut simplement dire que plus la « quantité de noyau » est grande par rapport à une quantité donnée de cytoplasme, plus la durée de l'interphase sera longue.

2) Si l'on examine de près les rapports nucléo-cytoplasmiques, on s'aperçoit qu'ils évoluent de façon tout à fait différentes selon les séries expérimentales. Dans les séries $1N + 1C$, $1N + 2C$ et $2N + 2C$, comme dans les cellules habituelles, le rapport nucléo-cytoplasmique augmente au cours de la vie de la cellule. Par contre, dans la série $2N + 1C$, le volume du cytoplasme augmente beaucoup plus vite que le volume des noyaux, si bien que le rapport nucléo-cytoplasmique diminue au cours de la vie cellulaire.

N

La diminution du rapport $\frac{\text{N}}{\text{C}}$ dans cette série, alliée à sa variabilité

C

d'une série à l'autre, semble remettre en cause les notions classiques d'une constance du rapport nucléo-cytoplasmique au moment de la mitose dans une même espèce cellulaire. Cela n'empêche pas l'existence d'une relation directe entre le rapport nucléo-cytoplasmique et le déclenchement de la mitose, comme nous avons pu le montrer.

B. INFLUENCE DE L'ABLATION DU NOYAU SUR LA MORPHOLOGIE DES DIFFÉRENTS ORGANITES

Depuis les premiers travaux de Barber (1), il est connu que l'ablation du noyau d'une cellule entraîne, à terme, la dégénérescence et la mort de celle-ci. Selon les espèces la survie des cellules est plus ou moins longue : quelques jours chez les amibes (36) à plusieurs semaines chez les acétabulaires (54 *bis*) par exemple.

Il était intéressant d'étudier avec les moyens modernes les phénomènes qui conduisent inéluctablement à la mort cellulaire. Les travaux de Brachet sur *Amoeba proteus* (4 à 7) ont déjà permis de savoir que certains enzymes disparaissent tandis que d'autres restent stables dans les fragments sans noyau.

L'aspect morphologique en microscopie électronique n'est pas moins important s'il permet de constater un comportement différent des divers organites au cours de l'agonie cellulaire. C'est cette étude, comparable à celle effectuée sur *Amoeba proteus* par Flickinger (44) qui a été l'objet de notre travail.

1. Devenir des amibes énucléées (microscopie photonique).

Immédiatement après l'ablation de son noyau, comme l'a signalé Fonbrune (28), l'amibe cesse tout mouvement pendant un temps puis les courants cytoplasmiques et les pseudopodes réapparaissent mais sans ordre, de façon anarchique. La vacuole pulsatile continue à fonctionner pendant 48 heures environ. La survie maximum du cytoplasme sans noyau est de 6 jours, ce qui est bien inférieur à la survie d'un cytoplasme d'*Amoeba proteus* (36). Les morts les plus précoces ont lieu vers 48 heures, la durée de vie moyenne est de l'ordre de 72 heures. Quoi qu'il en soit, « peu avant la lyse finale, la cellule se gonfle considérablement et sa surface, de fripée devient lisse ».

Ce sont là les seuls renseignements que la microscopie photonique a pu nous fournir. Nous avons donc essayé d'en apprendre davantage sur l'avenir de certains organites en microscopie électronique.

2. Méthode d'étude.

Une trentaine d'amibes ont été énucléées puis remises dans des boîtes de culture. Une partie d'entre elles a été fixée immédiatement après l'énucléation. Les autres ont été fixées 2 heures, 8 heures, 16 heures, 24 heures ou 48 heures après l'énucléation.

Les amibes de chaque série ont ensuite été préparées et examinées en microscopie électronique.

3. Résultats.

Les amibes fixées juste après énucléation et même les amibes fixées deux heures après celle-ci ont un cytoplasme qui nous est apparu tout à fait semblable à celui de l'amibe normale.

Les premières modifications ne surviennent que huit heures après l'énucléation. Elles ne concernent encore que les vacuoles digestives qui ne contiennent plus comme de coutume des germes à des stades divers de digestion, mais une substance amorphe et homogène où l'on ne perçoit plus aucune structure. Les autres organites sont encore parfaitement normaux à ce stade.

Seize heures après l'énucléation, les vacuoles digestives sont encore seules concernées : elles sont vides ou ne contiennent que de très rares résidus de germes. Elles resteront ainsi jusqu'à la lyse des cellules.

Au bout de 24 heures, par contre les lésions sont beaucoup plus importantes : les corps de Golgi ont presque tous dégénéré et l'on ne retrouve que des résidus des dictyosomes de forme variable : tantôt ils se gonflent en d'énormes vésicules, tantôt au contraire, la longueur des citernes diminue; de toutes façons, leur nombre est considérablement réduit, parfois même, il n'en subsiste qu'une seule (fig. 26).

Si l'on examine des amibes énucléées depuis 48 heures, il est très rare de voir subsister un fragment de dictyosome. Lorsqu'on en trouve, il est toujours extrêmement difficile d'affirmer qu'il s'agit bien de cette

structure car elle est tellement altérée qu'elle en devient méconnaissable.

La membrane cellulaire elle même subit une altération dont il est difficile de préciser la nature, mais qui la rend sensiblement plus fragile. En effet si la membrane apparaît identique à celle de l'amibe normale jusqu'à 16 heures après énucléation, elle n'est pratiquement plus visible après 24 heures. Elle est probablement éliminée lors des différents transferts de l'amibe avant l'inclusion à l'epon.

Contrairement à l'appareil de Golgi et à la membrane, les mitochondries demeurent morphologiquement normales jusqu'à la lyse de la cellule. Il en est de même pour les granulations que nous avons décrites (p.00).

Toutes ces observations confirment celles qui ont été effectuées par Flickinger sur l'*Amoeba proteus*. Par contre, nous n'avons pas retrouvé chez l'*Amoeba sphaeronucleolus* des profondes transformations de l'ergastoplasme décrites par cet auteur. Les sacs ergastoplasmiques qui sont de petite taille et dispersés dans tout le cytoplasme chez l'amibe normale conservent le même aspect jusqu'à la mort cellulaire.

4. Discussion.

Les modifications observées au cours de la survie du cytoplasme sans noyau portent essentiellement sur les vacuoles digestives, les corps de Golgi et la membrane cellulaire. Ces modifications pourraient être attribuées au fait que l'amibe ne se nourrit plus à partir du moment où le noyau a été ôté. Il en est bien ainsi, vraisemblablement, pour les vacuoles digestives qui sont vides de toute substance nutritive après une durée de 16 heures.

Par contre, en ce qui concerne les corps de Golgi et la membrane cellulaire, des témoins laissés à jeun ne présentent pas ces modifications (44). Il semble bien que le noyau intervienne dans le maintien de la structure des dictyosomes, que cette structure soit permanente et ne demeure telle que sous l'influence du noyau, ou qu'elle soit continuellement renouvelée et que ce renouvellement ait lieu sous la présidence du noyau.

Quant à la membrane cellulaire, son altération pourrait bien n'être que la conséquence de la destruction des corps de Golgi. On sait en effet (43) que la membrane des amibes est recouverte d'une substance probablement de nature polysaccharidique. Il est vraisemblable que les dictyosomes jouent un rôle dans la synthèse de ces polysaccharides. Il apparaîtrait alors naturel qu'une lésion des corps de Golgi entraîne rapidement des lésions de la membrane cellulaire.

L'intégrité des mitochondries ne saurait surprendre car l'on sait depuis Brachet (5) que la respiration des fragments anucléés est parfaitement normale jusqu'à la lyse de la cellule.

Le reste des éléments cellulaires nous a semblé, lui aussi, morphologiquement normal. Il n'est pas certain, pour autant, que ses fonctions

soient conservées. Le développement des membranes ergastoplasmiques observées par Flickinger chez *Amoeba proteus* est interprété par cet auteur comme la formation de cytolsomes, ce qui voudrait dire que l'amibe reconnaît son cytoplasme comme anormal et cherche à s'en débarrasser ou à s'en nourrir. Le comportement différent de l'*Amoeba sphaeronucleolus* peut s'expliquer soit par une altération autre du cytoplasme, soit par une réaction différente de cette amibe à des lésions identiques. Il paraît en effet difficile d'attribuer la présence ou l'absence d'altérations ergastoplasmiques à des artefacts de préparation.

V. RELATIONS NUCLÉO-NUCLÉAIRES CHEZ LES AMIBES BINUCLÉÉES

La technique du marquage à la thymidine ^3H de noyaux pour étudier leur devenir est désormais classique. Elle a été employée dans de nombreux cas soit pour étudier la synthèse du D.N.A., soit simplement pour différencier des noyaux d'origine différente dans des syncarions.

A notre tour, nous avons voulu utiliser cette technique pour étudier le devenir des noyaux que nous greffons dans les amibes. Cela nous a conduit à des observations surprenantes que nous avons, par la suite, essayé d'expliquer.

A. AMIBES NORMALES MARQUEES

En suivant les techniques de marquage que nous avons indiquées plus haut, nous obtenons, après développement des autoradiographies, des coupes qui sont entièrement marquées, noyau et cytoplasme, de façon extrêmement intense.

Devant cet aspect nous avons pensé qu'il s'agissait d'un excès de thymidine resté dans l'amibe, nous avons donc procédé aux lavages intenses dont nous avons parlé : séjour pendant une semaine des amibes dans une solution de thymidine froide, plus de 2 000 fois plus concentrée que la solution de marquage. Les images observées après le développement des coupes ont été exactement identiques aux précédentes. Cela nous a amené à conclure que le marquage cytoplasmique était fait de thymidine non libre.

B. GREFFE DU NOYAU D'UNE AMIBE MARQUEE DANS UNE AMIBE NORMALE

Nous avons greffé dans une amibe normale le noyau d'une amibe marquée puis fixé cette amibe deux heures plus tard.

Dans ces conditions, nous constatons que seul un des deux noyaux est marqué (et de façon intense); le marquage cytoplasmique et celui de l'autre noyau ne dépasse pas le bruit de fond.

Ce résultat, auquel on pouvait s'attendre, nous a conduit à étudier le devenir du noyau marqué après la mitose.

C. ETUDE DE LA MITOSE

Les amibes greffées comportant un noyau marqué et un noyau non marqué, ont été fixées plusieurs heures après la mitose de façon à laisser aux caryosomes le temps de se reconstituer au moins partiellement.

Les premiers résultats nous ont permis de constater que les quatre noyaux fils étaient marqués, au lieu de deux sur quatre comme cela aurait dû être. Devant ce transfert de marquage, nous avons décidé de fixer à des temps variables après la greffe les amibes opérées.

D. TRANSFERT DE MARQUAGE DANS LES AMIBES GREFFEES DEPUIS 18 HEURES ET PLUS

Nous avons pu constater qu'il y avait, dès avant la mitose, passage du marquage d'un noyau dans l'autre, sans que le marquage cytoplasmique dépasse le bruit de fond. Au bout de dix huit heures ce transfert de marquage a donc eu lieu et il n'augmente pratiquement plus entre 18 et 24 heures (fig. 27).

Si les deux noyaux sont marqués, nous constatons que l'un est toujours moins marqué que l'autre (il s'agit probablement du noyau greffé, mais rien ne nous permet de l'affirmer).

Il y a donc acquisition de marquage par le noyau non greffé. La première hypothèse qui vienne à l'esprit est que, lors de la greffe du noyau marqué, on ait entraîné un peu de cytoplasme qui, comme nous l'avons vu, est lui aussi marqué. Le deuxième noyau capterait une partie importante de ce marquage, le reste se diluant dans le cytoplasme.

Deuxième hypothèse, le marquage du deuxième noyau provient simplement du contact entre l'amibe marquée et l'amibe normale au moment de la greffe.

E. EXPERIENCES TEMOINS

Nous avons, pour tester la deuxième hypothèse, fixé des amibes qui étaient restées un temps largement supérieur à celui d'une greffe en contact étroit avec des amibes marquées. Nous n'avons constaté la présence d'aucun marquage après développement de l'émulsion photographique.

Pour tester la première hypothèse, nous avons greffé des noyaux marqués dans des amibes normales puis, au bout de quelques minutes, nous avons retiré le noyau marqué que nous venions de greffer. Là non plus, nous n'avons constaté aucun marquage sur les coupes. Nous pouvons donc penser que le marquage du noyau non greffé provient bien du marquage de l'autre noyau.

F. DISCUSSION

1) Le premier point qui mériterait d'être éclairci est celui de l'importance du marquage cytoplasmique. Nous avons vu qu'il s'agit très vraisemblablement de thymidine non libre. Plusieurs hypothèses se présentent pour expliquer un tel phénomène : a) Il s'agit encore de thymidine et elle est liée à une protéine de transport. Contre cette hypothèse : l'importance du marquage (car il faudrait que la protéine de transport soit d'une incroyable abondance) et le fait que les lavages à la thymidine froide ne provoquent aucun changement. b) Il ne s'agit plus de thymidine, le métabolisme de l'amibe serait capable de dégrader la thymidine en une autre base : Cytosine par exemple, ou Uridine. Il y aurait alors un marquage double du D.N.A. et du R.N.A. ce dernier expliquant le marquage cytoplasmique. Contre cette hypothèse : le fait que l'*Amoeba sphaeronucleolus* serait la seule cellule connue capable d'un tel métabolisme. c) Le marquage cytoplasmique est lui aussi un marquage de D.N.A. Etant donnée l'extrême densité des mitochondries que nous avons vue, la densité du marquage cytoplasmique s'expliquerait parfaitement par un marquage du D.N.A. mitochondrial. Cette hypothèse est encore renforcée par le fait que le cytoplasme de l'amibe absorbe le rayonnement ultraviolet à 2650 m μ autant que le noyau.

2) Le deuxième phénomène qui mérite de retenir l'attention est celui du transfert de marquage d'un noyau à l'autre après greffe. Là encore plusieurs hypothèses peuvent être retenues : a) Il s'agit d'un pool de thymidine liée à une protéine, comme cela existe chez certaines algues ; étant donné le renouvellement des protéines nucléaires observé par Goldstein (13-14) le transfert de marquage s'expliquerait aisément. b) Il peut également s'agir d'une dégradation de la thymidine, mais alors on s'explique très mal l'absence de marquage cytoplasmique. c) Enfin, il peut s'agir d'un transfert de parties de D.N.A. d'un noyau à l'autre, le D.N.A. pouvant être dégradé et réutilisé par le noyau pendant la vie de la cellule. Nous verrons dans la partie suivante que l'amibe est en fait probablement capable d'utiliser des molécules de D.N.A. placées dans son cytoplasme. Il reste la question de la dégradation du D.N.A. au cours de la vie de la cellule.

Constatons en premier lieu que si nous rapprochons les deux points précédents de la discussion, qui portent finalement tous deux sur la nature du marquage, l'hypothèse qui apparaît la plus vraisemblable est celle du marquage effectif du D.N.A. Ce qui semble, à première vue, aller contre cette hypothèse c'est la stabilité du marquage du D.N.A. par la thymidine dans toutes les expériences de marquage faites jusqu'à ce jour. En y regardant de plus près, jamais les conditions expérimentales n'ont permis d'affirmer qu'il s'agit du marquage définitif d'un D.N.A. immortel. Il peut tout aussi bien s'agir du marquage continu d'un D.N.A. en continu renouvellement, la cellule ne laissant plus

échapper la thymidine qu'on lui a fournie. La seule façon de mettre en évidence un tel renouvellement serait d'introduire dans la cellule un capteur de la thymidine libérée par le renouvellement du D.N.A. Il est possible que le noyau non marqué que nous avons introduit joue ce rôle.

Il faudrait pour pouvoir trancher entre les différentes hypothèses évoquées faire des autoradiographies de coupes ayant subi une digestion enzymatique, les unes par un enzyme protéolytique, les autres par la ribonucléase ou la désoxyribonucléase, ce que nous n'avons pu réussir jusqu'à ce jour.

VI. MITOSE DES AMIBES PLURINUCLÉÉES ET ANOMALIES EXPÉRIMENTALES DE LA MITOSE

Au cours de notre travail sur les amibes mono ou binucléées, nous avons eu fréquemment l'occasion d'observer des mitoses d'amibes à un ou plusieurs noyaux. L'observation seule nous a déjà apporté quelques résultats intéressants. C'est pourquoi, à l'aide des techniques de microchirurgie, nous avons expérimenté en intervenant directement sur des cellules en mitose. Si nos expériences ne donnent pas une vue d'ensemble des phénomènes mis en jeu, elles mettent en évidence un certain nombre de faits qui paraissent être en contradiction avec les données classiques.

A. MITOSE « HABITUELLE » DES AMIBES BINUCLEÉES

Par mitose « habituelle » nous entendons une mitose qui se déroule librement, sans intervention expérimentale, et qui représente l'immense majorité des mitoses des amibes à deux noyaux. Nous reviendrons plus loin sur les anomalies spontanées ou provoquées de telles mitoses. Cette mitose « habituelle » a été observée plusieurs centaines de fois sur des amibes binucléées obtenues par diverses méthodes. Il s'agissait soit d'amibes binucléées spontanées rencontrées dans les boîtes de culture (une dizaine) soit d'amibes greffées, soit encore d'amibes $2N + 2C$. Quelle que soit l'origine de l'amibe, la mitose « habituelle » possède les mêmes caractères.

1. Le cycle des modifications du noyau est le même qu'au cours de la mitose de l'amibe normale.
2. Les noyaux se divisent de façon synchrone .

Comandon et Fonbrune (35) avaient déjà observé ce fait. Ils avaient même greffé dans une amibe sur le point de se diviser un noyau dont le caryosome n'était pas encore reconstitué. Même dans ce cas, le noyau « âgé » attend plusieurs jours la maturation de l'autre noyau et leur mitose est synchrone.

Une précision peut cependant être apportée : le noyau « âgé » est bloqué seulement lorsqu'il a atteint un stade avancé de la désagrégation de son caryosome. Jusqu'à ce stade, il poursuit son évolution de façon autonome.

Il faut aussi remarquer que le synchronisme des noyaux n'est pas rigoureusement parfait. Il existe le plus souvent un léger décalage entre les deux noyaux. Ce décalage va de quelques secondes à quelques minutes.

3. L'étirement des noyaux se fait dans une direction variable.

La plupart du temps, mais non toujours, l'étirement des noyaux commence dans la même direction (les fuseaux étant parallèles). L'évolution de cet étirement est cependant tout à fait variable, les fuseaux pouvant rester parallèles ou faire entre eux un angle quelconque.

4. La division cytoplasmique donne naissance à deux, trois ou quatre amibes.

Les quatre noyaux obtenus se répartissent de façon variable dans ces cytoplasmes. Ainsi, on peut obtenir :

4 amibes avec chacune un noyau.

3 amibes : deux avec un noyau et une avec deux noyaux.

2 amibes possédant chacune deux noyaux.

2 amibes, l'une avec trois noyaux, l'autre avec un seul.

La taille des amibes est sans rapport avec leur nombre de noyaux, la distribution du cytoplasme et des noyaux se faisant en apparence indépendamment. Il est cependant un peu plus fréquent de voir de grosses amibes avec plusieurs noyaux et les petites avec un seul.

Le sillon marquant le début de la cytodiérèse peut être unique, et l'on obtiendra alors deux amibes, ou double. Il se forme en général dans une direction perpendiculaire à l'un des fuseaux. Lorsqu'il y a deux sillons, ils ne sont pas toujours synchrones et l'on peut voir deux amibes déjà séparées entrer à nouveau en cytodiérèse. Le deuxième sillon peut se former puis disparaître et réapparaître à un autre endroit, les courants cytoplasmiques ayant réapparu on ne peut, lorsqu'on observe une telle mitose prédire combien d'amibes elle fournira. Le nombre d'amibes résultant d'une telle division semble, à première vue, n'être du qu'au hasard (fig. 28).

5. La division du plasma pulsatile.

Elle se fait, comme dans l'amibe normale, par la striction que lui impose le ou les sillons de cytodiérèse. Chaque amibe se retrouve ainsi munie d'une quantité variable de plasma pulsatile.

6. Répartition des noyaux dans les cellules filles.

Nous avons dit plus haut que la division d'une amibe à deux noyaux en deux, trois ou quatre amibes semblait due au hasard. Pour le vérifier, il suffit de calculer le pourcentage de chacun des cas que nous devrions obtenir. Dans une première hypothèse, tous les noyaux sont équivalents

et se répartissent au hasard dans les fragments de cytoplasme mis à leur disposition (Hypothèse A). Dans une deuxième hypothèse, les noyaux issus d'un même noyau originel ne peuvent se retrouver dans un même cytoplasme (Hypothèse B).

Nous obtenons les pourcentages théoriques suivants :

	Hypothèse A	Hypothèse B
4 amibes à 1 noyau	51 %	66 %
3 amibes (1 à 2 noyaux et 2 à 1 noyau)	25,5 %	22 %
2 amibes à 2 noyaux	12,7 %	11 %
2 amibes (1 à 3 noyaux et 1 à 1 noyau)	8,5 %	0 %
1 amibe à 4 noyaux	2 %	0 %

Confrontons ces chiffres avec la réalité expérimentale : tout d'abord avec les amibes binucléées obtenues par greffe et remarquons que nous avons obtenu dans trois pour cent des cas deux amibes dont l'une est à trois noyaux et l'autre à un seul. L'hypothèse B est donc fausse : deux noyaux liés par une même fuseau peuvent fort bien demeurer au sein d'un même cytoplasme. Nous conservons, pour le moment, l'hypothèse A et nous la confrontons d'une part avec les amibes greffées (100 cas) d'autre part avec les amibes 2N + 2C (50 cas).

	Hypothèse A (théorique)	Amibes greffées (100 cas)	Amibes 2 N + 2 C (50 cas)
4 amibes à 1 noyau	51 %	46 %	30 %
3 amibes (1 à 2 noyaux et 2 à 1 noyau)	25,5 %	43 %	38 %
2 amibes à 2 noyaux	12,7 %	8 %	32 %
2 amibes (1 à 3 noyaux et 1 à 1 noyau)	8,5 %	3 %	0 %
1 amibe à 4 noyaux	2 %	0 %	0 %

Nous pouvons constater deux faits : a) la répartition réelle ne correspond pas, dans un cas ou dans l'autre, à la répartition théorique. Les répartitions des noyaux et des cytoplasmes ne sont donc pas des variables indépendantes. b) Cette répartition est extrêmement différente dans les amibes à deux noyaux des deux catégories.

Remarquons enfin que le fait de n'avoir pas observé d'amibe sans cytodiérèse n'est pas significatif, le pourcentage théorique est en effet suffisamment faible pour que le hasard nous ait dérobé de telles observations.

Les différents caractères des mitoses dans les amibes binucléées nous ont poussé à savoir ce qu'étaient les mitoses d'amibes à plus de deux noyaux.

B. MITOSES « HABITUELLES » DES AMIBES MULTINUCLEÉES

Signalons qu'une étude portant sur de nombreux cas est ici pratiquement impossible pour plusieurs raisons :

1) Nous avons vu que le cycle mitotique des amibes binucléées greffées était beaucoup plus long que celui des amibes normales. Ce cycle s'allonge encore à chaque noyau supplémentaire. La simple attente de ce cycle conduirait à des délais expérimentaux extrêmement longs.

2) Il est évidemment beaucoup plus long et plus difficile de greffer un nombre élevé de noyaux qu'un seul.

3) Les possibilités théoriques de divisions cytoplasmiques s'accroissent beaucoup plus vite que le nombre de noyaux, rendant impossible toute étude statistique.

Nous avons observé :

1. Six divisions d'amibes à 3 noyaux .

Deux ont donné 1 amibe à 2 noyaux et 4 amibes à 1 noyau,
les autres ont fourni soit : 1 amibe à 5 noyaux et une à 1 noyau,
1 amibe à 4 noyaux et 2 amibes à 1 noyau,
2 amibes à 3 noyaux,
3 amibes à 2 noyaux.

2. Une division d'amibe à 4 noyaux donnant une amibe à 6 noyaux et une à 2 noyaux.

3. Une division d'amibe à 5 noyaux donnant 10 amibes à un seul noyau.

4. Deux divisions d'amibes à 9 noyaux donnant des répartitions qu'il serait trop long d'énumérer.

Dans toutes ces divisions nous avons pu vérifier les faits déjà signalés dans les mitoses d'amibes binucléées :

- Le cycle des modifications du noyau ne varie pas.
- Les noyaux se divisent de façon quasi-synchrone.
- L'étirement des noyaux se fait dans des directions variables.
- Le nombre des cellules filles et la répartition du cytoplasme et des noyaux dans celles-ci se fait comme au hasard.
- Le cytoplasme pulsatile se répartit dans les cellules filles.
- La croissance en volume et la durée du cycle mitotique sont d'autant plus importantes qu'il y a un nombre plus grand de noyaux.

C. ANOMALIES SPONTANÉES OU EXPÉRIMENTALES DE LA MITOSE

1. Division nucléaire sans division cytoplasmique.

Ce phénomène est relativement fréquent chez les amibes normales en culture puisque l'on rencontre environ un pour dix mille individus binucléés. Il est surtout fréquent dans les cultures vieilles. Il peut même arriver qu'il y ait deux divisions nucléaires successives sans division cytoplasmique, puisque nous avons rencontré une fois en culture une amibe à 4 noyaux.

Nous avons vu, au début de ce travail, comment il était possible expérimentalement de produire le même résultat : il suffit de déplacer un des deux noyaux avant la cytodiérèse et de le placer à côté de l'autre. Il peut se développer cependant un deuxième sillon de cytodiérèse perpendiculaire au premier entre les deux noyaux. Il faut alors renouveler l'opération de déplacement d'un noyau.

Remarquons encore que le sillon de cytodiérèse amorcé ne disparaît pas, tout se passe comme si les deux noyaux groupés aspiraient le cytoplasme, faisant glisser le sillon jusqu'à l'extrémité de l'amibe.

2. Blocage d'un noyau en mitose.

Nous avons vu que plonger une amibe dans l'eau distillée au stade du noyau vide bloque la mitose et provoque une reconstitution du caryosome. Si nous nous adressons maintenant à une amibe binucléée, du fait du léger décalage qui existe dans la division des deux noyaux, nous pouvons bloquer le deuxième alors que le premier continue sa division. Si le noyau non divisé se trouve dans une amibe fille avec un autre noyau, il devra attendre la maturation de ce noyau pour entrer en division. Il est vraisemblable que l'on obtient alors un noyau diploïde.

Il est enfin possible de bloquer définitivement les mitoses d'un noyau en provoquant une lésion de la membrane nucléaire en certains points privilégiés. Le noyau continue à croître mais ne se divisera plus.

3. Cytodiérèse sans caryocinèse.

Nous avons observé à trois reprises une cytotiérèse considérablement retardée par rapport à la division des noyaux, c'est-à-dire survenant après complète reconstitution du caryosome (soit plusieurs heures). Dans le premier cas il s'agissait d'une amibe à 4 noyaux apparue spontanément en culture et qui donna 4 amibes. Dans les deux autres cas, il s'agissait d'amibes à trois noyaux. La première donna trois amibes à un noyau ; la dernière, fait encore plus surprenant fournit un fragment sans noyau et un autre avec trois noyaux.

Quoi qu'il en soit, il apparaît qu'une division cytoplasmique est possible sans qu'il y ait présence récente de fuseau. Nous verrons plus loin un autre fait pouvant confirmer cette constatation.

4. Fusions nucléaires et stathmocinèses.

Nous rappellerons pour mémoire l'obtention par Comandon et Fonbrune (30 à 35) de variétés diploïdes, tetra et octoploïdes que ces auteurs, en raison de l'augmentation de volume constatée, appelèrent 2V, 4V et 8V. Ces diverses variétés étant obtenues par injection de colchicine et stathmocinèse.

Il est possible d'obtenir mécaniquement, par lésion de la membrane nucléaire des fusions de noyaux : si, du fait de cette lésion, deux noyaux restent accolés, on observe la reconstitution d'un caryosome dans chacun de ceux-ci, mais la membrane nucléaire épaisse n'existe pas au point de contact des deux noyaux. Ce point de contact peut alors s'élargir et les deux caryosomes fusionner. On obtient ainsi un noyau unique, en général ovalaire, parfois encore bilobé, d'un volume du noyau normal (Noyau 2V). Lors de la mitose suivante, on peut assister à une division en apparence normale de ce noyau qui conduit à la formation de deux amibes 2V. Il est également possible que ce noyau donne directement 4 noyaux V au cours de la mitose, ou encore deux noyaux V et un noyau bilobé qui peut soit fusionner à nouveau, soit se séparer en deux noyaux V (fig. 29).

5. Raccourcissement du cycle mitotique .

Nous avons vu plus haut que le cycle mitotique des amibes normales était plus long que celui des amibes 1N + 2C, quoique ces deux séries d'amibes ne comportent qu'un noyau. Nous avons remarqué par ailleurs que le cycle mitotique des amibes normales raccourcissait lorsque nous les mettions en présence de thymidine marquée ou non. Cela nous a amené à penser que l'un des facteurs limitant la fréquence des mitoses était le manque des principes constitutifs du D.N.A. Ayant d'autre part la notion que ces amibes pouvaient vraisemblablement utiliser directement du D.N.A. pour leur synthèse, nous avons pensé pouvoir réduire la durée du cycle mitotique en mettant directement le matériel de synthèse dans le cytoplasme.

La méthode la plus simple était de greffer plusieurs noyaux dans une amibe et de les détruire mécaniquement à l'intérieur du cytoplasme. La greffe et la destruction d'un seul noyau réduit déjà ce cycle, mais en en greffant et en en détruisant 5 nous avons pu ramener la durée du cycle normal à 8 heures (temps minimum observé en culture primaire : 12 heures).

Il faut noter que cet apport réduit également (mais à un moindre degré) le cycle mitotique suivant puisque nous avons obtenu par cette méthode deux cycles mitotiques complets en 23 heures (normale 54 heures).

Une remarque supplémentaire s'impose : le rapport nucléo-cytoplasmique n'est pas du tout le même lors de ces divisions : le cytoplasme n'a pas eu le temps de croître suffisamment et les amibes sont encore très petites au moment de la mitose ; cette diminution de taille se poursuit à la génération suivante ; puis, peu à peu, la durée du cycle mitotique et le volume des amibes reviennent à la normale. Ce phénomène est assez comparable à celui qui se produit lors de la mise en culture d'amibes « sauvages ».

6. Cytodiérèse extraordinaire.

Sachant le synchronisme de division des noyaux dans les amibes plurinucléées il nous a paru intéressant de greffer un noyau interphasique dans une amibe en mitose. Nous avons procédé à cette greffe dans une amibe au stade 8 c'est-à-dire au moment où les noyaux sont nettement séparés, à peine reliés entre eux par quelques fibres évanescents, c'est-à-dire au stade précédant la cytodiérèse.

Après la greffe, nous avons eu la surprise de voir la cytodiérèse s'effectuer non pas entre les deux noyaux en fin de mitose, mais entre le noyau interphasique d'une part et les deux noyaux en fin de mitose d'autre part. Le noyau en interphase a donc emporté une partie du cytoplasme dans lequel il venait à peine d'être greffé, les deux autres noyaux constituant avec le cytoplasme restant une amibe binucléée qui évolua normalement.

D. DISCUSSION

Au terme de la description de ces diverses anomalies, quels sont les éléments que nous avons pu mettre en évidence et quelle valeur peut revêtir une telle recherche apparemment sans orientation bien définie ? Plusieurs apports nous semblent à retenir :

1. Apport technique.

Les diverses techniques utilisées pour obtenir les anomalies mitotiques sont en elles mêmes importantes car elles constituent la seule

méthode directe pour modifier le déroulement de la mitose. S'ajoutant aux expériences de Nicklas et Stachly (72-73) elles montrent que la microchirurgie est une méthode aux multiples possibilités pour l'expérimentation et la compréhension des phénomènes mitotiques.

2. La confirmation de certaines données classiques :

- Synchronisme de division des noyaux dans les cellules plurinucléées.

- Nombre des sillons de cytodiérèse dépendant du nombre des noyaux.

- Rôle important de la membrane dans les mitoses acentriques (puisque'une simple lésion mécanique peut entraîner une inhibition mitotique définitive).

- Apparition, en général, du sillon de cytodiérèse entre les noyaux divisés ...

3. L'infirmerie d'autres données :

- L'absence de fuseau n'empêche pas nécessairement la cytodiérèse.

- Le rapport nucléocytoplasmique n'est pas en relation directe avec les phénomènes mitotiques.

- La division de cellules plurinucléées est le plus souvent une mitose inégale.

- L'amibe peut réutiliser du matériel nucléaire directement placé dans son cytoplasme.

- La polyploïdie peut être obtenue par des voies purement mécaniques. Elle peut être définitive ou provisoire.

- La cytodiérèse peut s'effectuer entre un noyau interphasique et des noyaux en mitose.

4. Des faits inexpliqués :

- La division des amibes plurinucléées en un nombre d'amibes imprévisible et non dû exclusivement au hasard et la répartition des noyaux dans ces amibes.

- Le blocage des mitoses par l'eau au stade du « noyau vide ».

- La variabilité de la durée du cycle mitotique.

- La plupart des faits énumérés dans les deux paragraphes précédents qui confirment ou infirment les données classiques.

Au total, il s'agit là d'une expérimentation qui nécessite encore de longs développements et qui soulève jusqu'à présent plus de problèmes qu'elle n'en a résolus .

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ

Le présent travail apporte d'une part un complément d'information sur la cytologie de *Thecamoeba sphaeronucleolus* et en particulier constitue la première étude ultrastructurale de cette amibe. D'autre part, il précise le rôle joué par le noyau et le cytoplasme dans la croissance en volume de la cellule, le mode de dégénérescence des différents organites en l'absence du noyau et le transfert de matériel d'un noyau à l'autre. Enfin, il indique le mode de mitose des amibes plurinucléées et les modifications expérimentales qu'on peut lui apporter.

Les méthodes classiques de microscopie photonique et électronique ont été utilisées, fixations et inclusions étant adaptées au matériel d'expérience. Ce sont surtout les techniques de microchirurgie et, plus accessoirement, d'autoradiographie qui ont été employées dans les études plus physiologiques.

La première partie est l'étude morphologique de la *Thecamoeba sphaeronucleolus* en interphase et en mitose. Elle met en évidence la structure des différents organites : Membrane cytoplasmique recouverte d'une couche finement fibrillaire de nature probablement polysaccharidique laissant dépasser de longs filaments. Plasma pulsatile composé de groupements vacuolaires contigus centrés par une vacuole particulière et entourés d'une couche pratiquement continue de mitochondries. Vacuoles digestives et vacuoles de pinocytose. Mitochondries à tubes et granulations diverses dont certaines contiennent un paracristal. Dictyosomes isolés ou en amas. Ergastoplasme composé de petites vacuoles. Microfibrilles très nombreuses pouvant bifurquer et s'entrecroiser. Vacuoles à double membrane entourées de ribosomes. Absence de centrosphère.

L'étude du noyau montre l'existence d'une enveloppe très particulière composée de plusieurs couches, l'une superficielle comportant des pores hexagonaux au niveau desquels les membranes se rejoignent, l'autre profonde, fibrillaire présentant des canaux sous chacun des pores. Le suc nucléaire ne possède pas de structure particulière, contrairement au caryosome essentiellement composé de granules de 150 Angström de diamètre environ.

La mitose de cette amibe est annoncée par une vacuolisation progressive du caryosome qui semble disparaître, donnant au noyau un aspect « vide » en microscopie photonique. La microscopie électronique révèle déjà l'existence des membranes presque complètes des futurs noyaux ainsi que celle de nombreux faisceaux de microtubules. Au stade suivant se forme un anneau métaphasique constitué de petits

grains à la limite de la visibilité. Cet anneau se dédouble ensuite en deux anneaux qui s'écartent en s'épaississant pendant que les fibres fusoriales se font de plus en plus nettes. Au milieu du fuseau apparaît un « corps intermédiaire » annulaire. Au microscope électronique, les deux « noyaux fils » sont complètement reconstitués à ce stade et les premiers éléments du caryosome sont en voie de synthèse. Les noyaux s'écartent l'un de l'autre pour aller se placer contre la membrane cellulaire. L'ensemble de la caryocinèse s'est déroulée en l'absence de centrosome, entièrement à l'intérieur de l'enveloppe de l'ancien noyau.

La cytodierèse n'a pas de caractère particulier sinon la persistance de l'ancienne membrane nucléaire qui disparaîtra peu à peu dans les cellules filles tandis que la fusion progressive des éléments du caryosome redonnera à celui-ci sa forme sphérique.

Outre cette étude morphologique, une méthode pratique de mise en culture de cette amibe a été mise au point. La naissance des vacuoles digestives par la formation de « cheminées » a été précisée.

L'ensemble de ces données fournit les éléments de diagnose de cette espèce qui, malgré l'insuffisance des critères de classification des Amoebiens nus, semble devoir porter le nom de *Thecamoeba sphaeroneucleolus* Greeff.

Dans la deuxième partie de ce travail, un système expérimental (utilisant des énucléations, des greffes et des déplacements de noyaux) permet de faire varier le nombre de noyaux de l'amibe en gardant constante sa quantité de cytoplasme ou, inversement, de faire varier la quantité de cytoplasme « à noyaux constants ». Grâce à ce système, les courbes de croissance en volume d'au moins cinquante amibes ont été obtenues dans chacune des séries suivantes : Amibes normales (à un noyau et un cytoplasme), amibes à deux noyaux et un cytoplasme, amibes à un noyau et deux cytoplasmes, enfin, amibes à deux noyaux et deux cytoplasmes. La durée du cycle mitotique de chacune de ces séries a également été mesurée. Ces courbes et ces mesures ont amené aux conclusions suivantes : l'accroissement du volume cytoplasmique au cours de la croissance ne dépend que du nombre des noyaux contenus dans ce cytoplasme. La durée du cycle mitotique (ou longévité) d'une amibe varie comme son rapport nucléocytoplasmique (en volume). La valeur du rapport nucléocytoplasmique est sans influence directe sur le déclenchement de la mitose.

La troisième partie est consacrée à l'étude au microscope électronique du cytoplasme des amibes énucléées. Cette étude a montré la dégénérescence des différents organites : huit heures après l'énucléation, les vacuoles digestives ne contiennent plus qu'une substance amorphe ; au bout de seize heures elles sont entièrement vides. En vingt quatre heures les dictyosomes golgiens sont profondément altérés ainsi que la membrane cellulaire. Au terme de quarante-huit heures, juste avant la lyse de la cellule, seuls l'ergastoplasme et les mitochondries demeurent morphologiquement normaux. L'évolution des vacuoles

digestives montre que l'amibe énucléée n'est plus capable de phagocytose, mais peut encore digérer la nourriture absorbée.

Dans la quatrième partie, le marquage des amibes par la thymidine tritiée permet de mettre en évidence l'existence d'un marquage cytoplasmique important qui ne disparaît pas par lavage à la thymidine froide. La greffe d'un noyau d'amibe marquée dans une amibe normale conduit à un transfert de marquage du noyau marqué au noyau normal sans marquage cytoplasmique. Ce transfert peut être attribué à un pool de thymidine ou bien à un transfert et à une réutilisation du D.N.A. lui-même.

Enfin, les nombreuses amibes à deux noyaux obtenues au cours des diverses expérimentations ont permis l'étude des mitoses d'amibes binucléées : le cycle de modification des noyaux est identique (quoique plus lent) à celui des amibes normales. La répartition du plasma pulsatile n'a rien de particulier. Mais il existe des caractères propres aux amibes binucléées : synchronisme presque parfait des divisions nucléaires. Etirement des noyaux dans deux directions le plus souvent parallèles mais pouvant faire entre elles un angle quelconque. Répartition variable des quatre noyaux résultant des caryocinèses dans les deux, trois ou quatre cytoplasmes résultant de la cytodiérèse. Retour obligatoire, après une ou plusieurs générations, à la lignée normale mononucléée.

Les données obtenues sur les amibes binucléées ont été vérifiées sur des amibes multinucléées à trois, quatre, cinq, six et neuf noyaux. Ces dernières ont permis d'établir que la croissance en volume et la durée du cycle mitotique sont d'autant plus importantes que le nombre des noyaux est plus élevé .

Des anomalies de mitoses ont été observées et d'autres provoquées expérimentalement chez des amibes mono ou plurinucléées : division nucléaire sans division cytoplasmique et, inversement, cytodiérèse sans caryocinèse ; blocage provisoire ou définitif de noyaux en mitose et polyploïdie ; fusions nucléaires ; raccourcissement du cycle mitotique et mise en évidence de la réutilisation des divers composés du noyau par l'amibe. Cytodiérèse extraordinaire enfin, obtenue entre un noyau en interphase et deux noyaux en mitose. Ces différentes anomalies permettent d'affirmer que l'absence de fuseau n'empêche pas nécessairement la cytodiérèse, que le rapport nucléocytoplasmique n'est pas en relation directe avec les phénomènes mitotiques, que la division des cellules plurinucléées est le plus souvent inégale. Le rôle de la membrane nucléaire est particulièrement important dans une telle mitose acentrique car une simple lésion localisée de la membrane peut entraîner une inhibition mitotique définitive.

Vu et approuvé

Paris, le 30 mai 1970.

Le Doyen
de la Faculté des Sciences de Paris

MARC ZAMANSKY.

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

ROBERT MALLET.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARBER M.A. 1914. The pipette method in the isolation of single micro-organisms and in the inoculation of substances into living cells. *The philippine Journal of Science* **9**, 308-358.
2. BELAR K. 1926. Der Formwechsel der Protistenkerne. *Gustav Fischer*. Ed. Iena.
3. BHOWMICK D.K. and WOHLFORTH BOTTERMANN K.E. 1966. An improved method for fixing amoebae for electron microscopy. *Exptl. Cell Res.* **40**, 252.
4. BRACHET J. 1950. The localisation and the role of ribonucleic acid in the cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **50**, 861-869.
5. BRACHET J. 1954. Le noyau et les activités enzymatiques de la cellule. *Gazeta Medica Portuguesa* **7** N° 1, 206-212.
6. BRACHET J. 1955. Action of ribonuclease and ribonucleic acid on living amoebae. *Nature* **175**, 851-853.
7. BRACHET J. 1955. Recherches sur les interactions biochimiques entre le noyau et le cytoplasme chez les organismes unicellulaires. *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 247-268.
8. BRANDT P.W. and PAPPAS G.D. 1960. An electron microscopic study of pinocytosis in Amoeba I - The surface attachment phase. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol* **8**, 675-687.
9. BRANDT P.W. and PAPPAS G.D. 1962. An electron microscopic study of pinocytosis in Ameba II - The cytoplasmic uptake phase. *J. Cell Biol.* **15**, 55-71.
10. BRIGGS R. and KING T.J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **38**, 455-463.
11. BRIGGS R. and KING T.J. 1953. Factors affecting the transplantability of nuclei of frog embryonic cells. *J. Exptl. Zool.* **122**, 485-503.
12. BRIGGS R. and KING T.J. 1959. Nucleocytoplasmic interactions in eggs and embryos. *In : The Cell* N° 1, 537-617 Acad. Press N.Y.
13. BYERS T.J. PLAT D.B. and GOLDSTEIN L. 1963 a. The cytonucleoproteins of Amoebae I - Some chemical properties and intracellular distribution. *J. Cell Biol.* **19**, 456-466.
14. BYERS T.J. PLAT D.B. and GOLDSTEIN L. 1963 b. The cytonucleoproteins of Amoebae II - Some aspects of cytonucleoproteins behavior and synthesis. *J. Cell Biol.* **19**, 467-475.
15. CHABRY L. 1886. Tube capillaire porte objet et perforation des éléments cellulaires. *C.R. Soc. Biol.* **2**, 322-323.
16. CHABRY L. 1886. Note sur les monstres demi-individus latéraux. *C.R. Soc. Biol.* **2**, 323-324.
17. CHAMBERS R. 1922. New apparatus and methods for the dissection and injection of living cells. *Anatomical Record* **24**, 1, 1-19.
18. CHAMBERS R. 1950. The cell as a functional body. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **50** Art. 8, 817-823.
19. CHAMBERS R. 1951. Micrurgical studies on the kinetic aspects of cell division. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 1311-1326.
20. CHAMBERS R. and FELLIS H.B. 1931. Micro-operations on cells in tissue culture. *Proc. Roy. Soc. London B* **109**, 380-403.

21. CHAMBERS A. and HÖFLER K. 1931. Micrurgical studies on the tonoplast of *Allium Cepa*. *Protoplasma* **12**, 3, 338.
22. CHAMBERS R. KOPAC M.J., and GRAND C.G. 1937. The living cell, physical properties of and microchemical reactions. *Industrial and Engineering Chemistry* **9**, 143-145.
23. CHATTON E. 1910. Essai sur la structure du noyau et la mitose chez les amœbiens. Faits et théories. *Arch. Zool. Exp. et Gle. 5^e série*, **5**, 267-337.
24. COHEN A.I. 1957. Electron microscopic observations of *Amoeba Proteus* in growth and inanition. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* **3** (6), 859-866.
25. COLE R.J. and DANIELLI J.F. 1963. Nuclear-cytoplasmic interactions in the responses of *Amoeba Discoïdes* to streptomycin. *Exptl. Cell Res.* **29**, 199-210.
26. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1937. Mécanisme de la préhension de microbes et absorption de bulles d'air par une amibe : *Amoeba Terricola*. (Enregistrement cinématographique). *C.R. Soc. Biol.* **124**, 634-636.
27. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1938. La chambre à huile. *Ann. Inst. Pasteur* **60**, 113-142.
28. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1939. Ablation du noyau chez une amibe. Réactions cinétiques à la piqure de l'amibe normale et dénucléée. *C.R. Soc. Biol.* **130**, 740-744.
29. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1939. Greffe nucléaire totale, simple ou multiple, chez une amibe. *C.R. Soc. Biol.* **130**, 744-748.
30. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1942. Action de la colchicine sur *Amoeba Sphaeronucleus*. Obtention de variétés géantes. *C.R. Soc. Biol.* **136**, 410-411.
31. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1942. Etude volumétrique comparative d'*Amoeba Sphaeronucleus* et de deux variétés obtenues par l'action de la colchicine. *C.R. Soc. Biol.* **136**, 423.
32. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1942. Anomalies de la division observée à partir de noyaux atypiques chez *Amoeba Sphaeronucleus* et ses variétés colchiciniques. *C.R. Soc. Biol.* **136**, 460-461.
33. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1942. Greffes nucléaires croisées entre *Amoeba Sphaeronucleus* et l'une de ses variétés colchiciniques. *C.R. Soc. Biol.* **136**, 746-747.
34. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1942. Modifications héréditaires de volume provoquées par l'échange de noyau entre l'*Amoeba Sphaeronucleus* et ses variétés colchiciniques. *C.R. Soc. Biol.* **136**, 747-748.
35. COMANDON J. et FONBRUNE P. de 1942. Influence des stades évolutifs du cytoplasme et du noyau greffé d'*Amoeba Sphaeronucleus* sur leur volume respectif et sur le déclenchement de la caryocinèse. *C.R. Soc. Biol.* **136**, 763-764.
36. DANIELLI J.F. 1952. On transplanting Nuclei. *Sci. American* **186** (4), 58-64.
37. DANIELLI J.F. 1958. The relationship between Nucleus and Cytoplasm (Some theoretical aspects of nucleocytoplasmic relationship). *Exptl. Cell Res. Suppl.* **6**, 252-267.
38. DANIELLI J.F. 1958. Studies of inheritance in amoebae by the technique of nuclear transfer. *Proc. Roy. Soc. B* **148**, 321-331.
39. DANIELLI J.F. 1962. The theory of cells in relation to the study of cytoplasmic inheritance in *Amoeba* by nuclear transfer. *The Harvey Lecture, Série 58 Acad. Press. N.Y.*, 217-231.
40. DANIELLI J.F., LORCH I.J., ORD M.J., and WILSON E.G. 1955. Nucleus and cytoplasm in cellular inheritance. *Nature* **176**, 1114-1115.
41. DANIELLI J.F. and MUGGLETON A. 1959. Some alternative states of *Amoeba* with special reference to life span. *Gerontologia J.* **3**, 76-90.
42. EDSTROM J.E. 1953. Ribonucleic acid mass and concentration in individual nerve cells. A new method for quantitative determination. *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 361-386.

43. FAURE - FREMIET E. et ANDRÉ J. 1968. Structure corticale d'une amibe edaphique. *Protistologica* **4**, (2), 195-207.
44. FLICKINGER C.J. 1968. The effect of enucleation on the cytoplasmic membranes of *Amoeba Proteus*. *J. Cell Biol.* **37**, 300-315.
45. FONBRUNE P. de 1949. Technique de micromanipulation. Masson et Cie Ed. Paris.
46. GIBSON I. 1968. Studies on the incorporation of D.N.A. into *Paramecium Aurelia*. *J. Cell Sci.* **3**, 381-389.
47. GOLDSTEIN L. and PLAUT W. 1955. Direct evidence for nuclear synthesis of cytoplasmic R.N.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **41**, 874-880.
48. GOLDSTEIN L. and PRESCOTT D.M. 1968. Proteins in nucleocytoplasmic interactions II - Turnover and changes in nuclear protein distribution with time and growth. *J. Cell Biol.* **36**, 53-61.
49. GRASSE P. 1953. Ordre des amœbiens nus ou Amœbaeae. In : *Traité de zoologie* **1** (2), 5-91. Masson Ed. Paris.
50. GREEFF R. 1866. Über einige in der Erde lebende Amöben und andere Rhizopoden. *Arch. F. Mikr. Anat.* **2**, 299-331.
51. GREEFF R. 1891. Organismus der Amöben. *Biolog. Centrabl.* **11** (19), 599-608 und 633-640.
52. GREIDER M.H., KOSTIR W.J., and FRAJOLA W.J. 1956. Electron microscopy of the nuclear membrane of *Amoeba Proteus*. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* **2** Suppl. 4, 445-448.
53. GRELL K.G. 1964. The protozoan nucleus. In : *The Cell* **6**, 1-79 Acad. Press N.Y.
54. GROSSE - ALLERMAN W. 1909. Studien über *Amoeba Terricola* Greeff. *Arch. Protistenk.* **17**, 203-257.
55. HAWKINS S.E., and COLE R.J. 1965. Studies on the basis of cytoplasmic inheritance in *Amoebae*. *Exptl. Cell Res.* **37**, 26-38.
56. HAWKINS S.E., COLE R.J. and DANIELLI J.F. 1962. Preliminary studies on the basis of cytoplasmic inheritance in *Amoebae*. *Nature* **196**, 396.
57. HAWKINS S.E. and DANIELLI J.F. 1961. Investigation of free amino acid differences in *Amoebae*. *Exptl. Cell Res.* **23**, 504-509.
- 57 bis HORSTMANN L.M. 1968. Untersuchungen über die Schutzwirkung des Germanin bei Chemischen und Physikalischen Reisen auf *Amoeba sphaeronucleolus* Greeff unter Anwendung der Zeit transformation (Zeitraffung). *Arch. Protistenk.* **111**, 38-81.
58. HOUSSAY D. 1968. Etude de la physiologie des cellules animales par la microchirurgie. Thèse Faculté de Médecine Paris.
59. HOUSSAY D. et PRENANT M. 1970. *Thecamoeba Sphaeronucleolus* : Données physiologiques et étude morphologique en microscopie optique et électronique. *Arch. Protistenk.* **112** (3). Sous presse.
60. HOUSSAY D. et PRENANT M. Détermination par les techniques de microchirurgie du rôle respectif du noyau et du cytoplasme dans la croissance et dans la durée de l'interphase chez *Thecamoeba Sphaeronucleolus*. *Exptl. Cell Res.* Sous presse.
61. KING T.J. 1966. Nuclear transplantation in Amphibia. In : *Methods in cell Physiol.* **2**, 1-36 D.M. Prescott Ed.
62. KROEGER H. 1966. Micrurgy on cells with polytene chromosomes. In : *Methods in cell Physiol.* **2**, 61-92. D.M. Prescott Ed.
63. LEACH W.M. 1968. The thymidine pool in grass hopper neuroblasts during mitosis. *J. Cell Biol.* **36**, 282.
64. LONI 1969. Communication personnelle.
65. LORCH I.J. and DANIELLI J.F. 1950. Transplantation of nuclei from cell to cell. *Nature* **166**, 329-330.
66. LORCH I.J. and DANIELLI J.F. 1953 a. Nuclear transplantation in *Amoebae* I - Some species characters of *Amoeba Proteus* and *Amoeba Discoïdes*. *Quart. J. Microscop. Sci.* **94**, 445-460.

67. LORCH I.J. and DANIELLI J.F. 1953 b. Nuclear transplantation in Amoebae II - The immediate results of transfer of nuclei between Amoeba Proteus and Amoeba Discoïdes. *Quart. J. Microscop. Sci.* **94**, 461-480.
68. MATTES O. 1924. Über Lebensweise, Morphologie und Physiologie von Amoeba Sphaeronucleolus Greeff. *Arch. Protistenk.* **47**, 386-412.
69. MAZIA D. 1961. Mitosis and the physiology of cell division. In : *The cell* **3**, 77-422 Acad. Press N.Y.
70. MILLER O.L., STONE G.E. and PRESCOTT D.M. 1964. Autoradiography of soluble materials. *J. Cell Biol.* **23**, 654.
71. NACHMIAS V.T. 1968. Further electron microscope studies on fibrillar organisation of the ground cytoplasm of Chaos -Chaos. *J. Cell Biol.* **38**, 40-50.
72. NICKLAS R.B. and STAEHLY C.A. 1967. Chromosome micromanipulation I - The mechanics of chromosome attachment to the spindle. *Chromosoma* **21**, 1-16.
73. NICKLAS R.B. 1967. Chromosome micromanipulation II - Induced reorientation and the experimental control of segregation in meiosis. *Chromosoma* **21**, 17-50.
74. ORD M.J. 1968. The sythesis of D.N.A.; through the cell cycle of Amoeba Proteus. *J. Cell Sci.* **3**, 483-491.
75. ORD M.J. 1969. Control of DNA synthesis in Amoeba Proteus. *Nature* **221**, 964-966.
76. ORD M.J. and BELL L.G.E. 1968. Nuclear transplants between Normal and Mutant Amoebae. *Nature* **218**, 384.
77. PAPPAS G.D. 1956. The fine structure of the nuclear envelope of Amoeba Proteus. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* **2** suppl. 4, 431-434.
78. PENARD E. 1905. Observations sur les amibes à pellicule. *Arch. Protistenk.* **6**, 175-206.
79. PENARD E. 1909. Sur quelques rhizopodes des mousses. *Arch. Protistenk.* **17**, 258-296.
80. PETERFI T. und NAVILLE A. 1931. Die Wirkung des Kernanstiches auf das Protoplasma der Amoeba Sphaeronucleus. *Protoplasma* **12**, 524-537.
81. PRENANT M. 1967. Problèmes concernant les micro-injections et les greffes nucléaires. Diplôme E.P.H.E.
82. PRESCOTT D.M. 1955. Relations between cell growth and cell division. I - Reduced weight, cell volume, protein content and nuclear volume of Amoeba Proteus from division to division. *Exptl. Cell Res.* **9**, 328-337.
83. PRESCOTT D.M. 1956. Relations between Cell Growth and Cell Division. II - The effect of cell size on cell growth rate and generation time in Amoeba Proteus. *Exptl. Cell Res.* **11**, 86-94.
84. PRESCOTT D.M. 1956. Relations between cell growth and cell division. III - Changes in nuclear volume and growth rate and prevention of cell division in A Proteus resulting from cytoplasmic amputation. *Exptl. Cell Res.* **11**, 94.
85. PRESCOTT D.M. and CARRIER R.F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for Euplotes Eurystomus and Amoeba Proteus. In : *Methods in cell Physiol.* **1**, 85-95.
86. PRESCOTT D.M. and GOLDSTEIN L. 1967. Nuclear-cytoplasmic interaction in D.N.A. synthesis. *Science* **155**, 469-471.
87. PUSSARD M. 1964. Acanthamoeba Comandoni n. sp. Comparaison avec Acanthamoeba Terricola Pussard. *Rev. Ecol. Biol. Sol* **1**, (4), 587-610.
88. PUSSARD M. 1967. Les protozoaires du sol. *Ann. Epiphyties* **18** (3), 335-360.
89. RABINOVITCH M. and PLAUT W. 1962 a. Cytoplasmic D.N.A. synthesis in Amoeba Proteus. I - On the particulate nature of D.N.A. - containing elements. *J. Cell Biol.* **15**, 525-534.

90. RABINOVITCH M. and PLAUT W. 1962 b. Cytoplasmic D.N.A. synthesis in Amoeba Proteus. II - On the behavior and possible nature of the D.N.A. - containing elements. *J. Cell Biol.* **15**, 535-540.
91. ROTH L.E., OBETZ S.W. and DANIELS E.W. 1960. Electron microscopic studies of mitosis in Amoebae. I - Amoeba Proteus. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* **8**, 207-220.
92. SCHOUTEN S.L. 1934. Der Mikromanipulator. *Zeitch. f. Wissench. Mikrosk. Tech.* **51**, 421-515.
93. SEIFRIZ W. 1936. Micrurgy. In : *Protoplasm* Mc Graw Hill Ed. N.Y., 47-64.
94. TARTAR V. 1964. Experimental techniques with ciliates. In : *Methods in Cell Physiol.* **1**, 109-125. D.M. Prescott Ed.
95. TAYLOR C.V. and FARBER W.P. 1924. Fatal effects of the removal of the micronucleus in Euplotes. *Univ. California Publication in Zool.* **26**, 131-141.
96. TRAGER W. 1964. The cytoplasm of protozoa. In : *The Cell* **6**, 81-137. Acad. Press. N.Y.
97. WITTMANN H. 1950. Untersuchungen zur Dynamik einige Lebensvorgänge von Amoeba Sphaeronucleolus Greeff bei natürlichem « Zeitmoment » und unter Zeitraffung. Erster Teil. *Protoplasma* **39**, 450-482.
98. WITTMANN H. 1951. Untersuchugen zur Dynamik einige Lebensvorgänge von Amoeba Sphaeronucleolus Greeff bei natürlichem « Zeitmoment » und unter Zeitraffung. Zweiter Teil. *Protoplasma* **40**, 23-47.
99. REYNOLDS 1963. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol* **17**, 208.
100. BANDHUIN P. 1969. Peroxysomes. In *Handbook of molecular cytology* Lima de Faria Ed. Amsterdam-London. p. 1179 à 1195.
101. LIMA DE FARIA 1969. DNA replication and gene amplification in heterochromatin. In *Handbook of molecular cytology*. Lima de Faria Ed. Amsterdam-London. p. 277-325..

LÉGENDES DES FIGURES

FIG. 1. — Montage de la préparation pour l'évaluation du volume cellulaire.

En haut : Vue en coupe du montage. L'amibe est placée entre la lame et la lamelle à « pieds ». L'anneau de hyaloplasme entourant l'amibe est indiqué (voile). Les lettres h et h' représentent la hauteur de l'amibe selon qu'un côté ou l'autre de la lamelle est utilisé. Le diamètre D est mesuré à mi-distance des bords de l'anneau hyaloplasmique.

En bas : Vue en plan. La lamelle qui recouvre l'amibe a été agrandie (dimensions réelles $0,5 \times 0,5$ cm). D et d sont les diamètres extrêmes de l'amibe qui sont mesurés pour obtenir le diamètre moyen.

FIG. 2. — *Thecamoeba Sphaeronucleolus* : Etat frais en microscopie optique.

En haut : Les deux photographies montrent des amibes en culture sur une couche de gélose. Elles se déplacent toutes deux vers le haut. L'amibe de gauche ($\times 460$) laisse voir à l'avant le voile hyaloplasmique. A l'arrière, la vacuole pulsatile est nettement dessinée. A la partie médiane et à gauche, on aperçoit le noyau. L'amibe de droite ($\times 410$) est plus allongée. Son noyau est situé au centre et sa vacuole pulsatile en voie de reconstitution. Les irrégularités du fond de la préparation sont dues à la présence de petites colonies de bactéries.

En bas : La même amibe photographiée successivement en contraste de phase (à gauche) et en fond clair ($\times 500$). On voit nettement le noyau et son caryosome rond central, la vacuole pulsatile en formation.

Que l'amibe se déplace sur la gélose ou soit examinée entre lame et lamelle, la limite endoplasmique reste très visible.

FIG. 3. — *Thecamoeba Sphaeronucleolus* : Vue d'ensemble en microscopie électronique ($\times 5.000$).

Il est difficile d'obtenir une vue d'ensemble complète d'une coupe d'amibe au microscope électronique puisqu'il faut descendre à des grossissements inférieurs à 1000 fois. Ce grossissement, très faible, rend de telles vues d'ensemble complètes sans intérêt. Cette photographie laisse voir dans son angle inférieur droit une partie du noyau et du caryosome. Le caryosome est déjà inhomogène avec de nombreuses zones claires; la membrane nucléaire apparaît assez épaisse; le nucléoplasme semble homogène et légèrement granulaire. Dans le cytoplasme, des vacuoles digestives contenant des bactéries sont nettement visibles ainsi que de très nombreuses mitochondries.

A ce grossissement, le reste du cytoplasme apparaît granulaire sans que l'on puisse définir la nature de ces granulations. Sur cette photographie le hyaloplasme est extrêmement étroit et la membrane cytoplasmique qui limite la cellule à l'angle supérieur gauche, pratiquement invisible.

FIG. 4. — Membrane cytoplasmique.

En haut : Vue en fond clair ($\times 2.500$) au microscope optique, la membrane cytoplasmique apparaît nettement plissée et présente un double contour. C'est sur cet aspect que Pénard a conclu à l'existence d'une couche particulière recouvrant la membrane proprement dite.

Au milieu ($\times 100.000$) *et en bas* ($\times 120.000$) : Membrane cytoplasmique vue au microscope électronique. Les diverses zones sont nettement visibles. Dans le hyaloplasme de la photographie du bas, on note la présence d'un certain nombre de granulations dont certaines semblent être du glycène.

FIG. 5. — Vacuoles.

En haut : ($\times 4.400$). Une partie d'une vacuole digestive située à proximité immédiate du noyau comme cela est la règle juste après l'absorption. Les bactéries sont serrées les unes contre les autres et sont encore pratiquement intactes.

Au milieu : ($\times 36.000$). Petite vacuole digestive contenant des germes en voie de digestion. On remarque que certains sont à peine altérés alors qu'il ne reste pour d'autres, que la membrane. D'autre part, la structure de la membrane vacuolaire est la même que celle de la membrane cytoplasmique.

En bas : ($\times 8.400$). Membrane cytoplasmique : Formation de vacuoles de pinocytose.

FIG. 6. — Mitochondries et granulations ($\times 34.000$).

Quatre mitochondries à crêtes tubulaires sans élément particulier sont visibles, ainsi que deux « granulations » comportant en leur centre un paracristal.

FIG. 7. — Corps de Golgi et fibrilles.

En haut : Amas de dictyosomes comme on en trouve fréquemment dans le cytoplasme d'une Thecamoeba Sphaeronucleolus ($\times 40.000$).

En bas à gauche : Dictyosome isolé ($\times 40.000$).

En bas à droite : Fibrilles cytoplasmiques ($\times 31.000$) comme on en rencontre un peu partout dans le cytoplasme. On remarque le renforcement du contraste des fibres par endroit et la division en deux vers le bas du faisceau qui est unique en haut.

FIG. 8. — Formations vermiculaires et vacuoles à membrane double.

En haut : Formation vermiculaire ($\times 56.000$). On note la présence de fibrilles à la partie supérieure de la photographie, présence purement fortuite puisque de telles formations ont été vues dans un noyau.

En bas : Trois vacuoles à membrane double ($\times 78.000$). provenant d'un même cliché. On voit nettement la couronne de ribosomes qui entoure la membrane extérieure.

FIG. 9. — Vue d'ensemble du noyau ($\times 9.200$).

La membrane nucléaire est épaisse et striée de canaux perpendiculaires à la surface. Le nucléoplasme, en dehors d'un substrat granuleux et homogène, présente quelques granulations plus volumineuses ainsi que de courtes formations allongées (FA) qui se révèlent, à plus fort grossissement, composées de granules disposés en ligne. Au centre, le caryosome présente déjà quelques zones claires.

FIG. 10. — Coupes superficielles du noyau ($\times 9.200$).

En haut : La coupe est située très près de la surface du noyau, elle passe par la couche fibreuse située immédiatement en dessous des pores nucléaires. On voit nettement que les fibres délimitent entre elles des canaux. Sur la gauche les deux lignes sombres pourraient représenter une plaque atractophorienne.

En bas : La coupe est un peu plus profonde et laisse apercevoir en son centre le nucléoplasme.

FIG. 11. — Membrane nucléaire.

En haut : Après une fixation à l'acide osmique seul, la couche profonde de la membrane nucléaire semble homogène. La structure apparaît toujours granulaire. Une partie du caryosome est également visible ($\times 20.000$).

Au milieu : La double fixation glutaraldéhyde-acide osmique montre la structure des couches superficielles et profondes de la membrane ($\times 34.000$).

En bas : Cette structure est plus nettement visible ($\times 67.000$), avec la double membrane qui se réunit au niveau des pores. Sur la gauche, on peut se rendre compte que les canaux déterminés par les fibres dans la membrane, correspondent aux pores nucléaires.

FIG. 12. — Maquette de la membrane nucléaire.

Cette maquette figure un rectangle de la membrane nucléaire coupé sur toute sa hauteur.

A la partie supérieure : La surface de la membrane. On note la présence de nombreux pores hexagonaux (P) régulièrement disposés, qui apparaissent en creux. Sur les côtés, figurent des coupes radiales de la membrane. On voit que la partie supérieure de la membrane est composée de deux doubles membranes qui sont tantôt rapprochées (au niveau des pores) tantôt éloignées.

A la partie inférieure, les fibres décrivent diverses sinuosités, elles font le tour des canaux verticaux situés sous les pores (C) et remplissent les intervalles qui séparent les canaux (I).

L'ensemble de la maquette est à l'échelle pour un grossissement de 200.000, excepté l'épaisseur des membranes vues en coupe qui est inférieure à la réalité.

FIG. 13. — Nucléoplasme et caryosome.

En haut : Suc nucléaire contenant trois des formations allongées que nous avons signalées ($\times 35.000$). Il est difficile de distinguer la structure de ces formations qui sont très opaques aux électrons. On peut apercevoir cependant, en haut et à droite, des granulations denses groupées autour d'un « tube » dont les limites sont elles-mêmes constituées d'un alignement de grains plus denses encore.

En bas : Limite entre le nucléoplasme et le caryosome ($\times 81.000$). Les granulations du caryosome sont bien visibles en haut. Il n'existe pas de limite marquée du caryosome et les fibrilles qu'il contient sont pratiquement invisibles sur cette photographie. Il manque également les formations allongées qui se rencontrent aussi bien dans le caryosome que dans le suc nucléaire.

FIG. 14. — Evolution du noyau au cours d'un cycle mitotique ($\times 530$).

Ce montage photographique indique les diverses modifications qui interviennent pendant toute la durée de la vie d'une amibe. Les heures approximatives à partir du stade 1 sont indiquées en bas et à gauche de chaque photographie.

Le stade 1 est représenté par la première photographie.

Le stade 2 par la deuxième.

Le stade 3 par les troisième et quatrième.

Le stade 4 par la cinquième.

Le stade 5 par la sixième.

Le stade 6 par la septième.

Le stade 7 par les huitième, neuvième, dixième, onzième, douzième et treizième.

Le stade 8 par les quatorzième, quinzième, seizième, dix-septième.

La cytodierèse prend place entre la dix-septième et la dix-huitième.

Les photographies suivantes montrent la reconstitution du caryosome.

FIG. 15. — **Schéma du « noyau vide »** (grossissement approximatif $\times 5.000$).

Ce schéma a été dessiné à partir d'un montage photographique complet à un grossissement de 70.000. Le faible contraste et le fort grossissement rendent impossible la présentation d'un tel montage. L'épaisseur des membranes et des granulations est fortement exagérée sur le schéma. On distingue de la périphérie vers le centre la couche superficielle (C S) puis la couche profonde (C P) de l'ancienne membrane. La nouvelle membrane déjà formée (N M). Le nucléoplasme (N P) et les microtubules (M T).

FIG. 16. — **Etirement du noyau.**

En haut : ($\times 1.100$). Coupe longitudinale où l'on distingue les deux noyaux reliés par le fuseau et enveloppés de l'ancienne membrane nucléaire. Au milieu du fuseau le « corps intermédiaire » est nettement visible, traversé par les faisceaux de microtubules. Autour des nouveaux noyaux, il existe un certain nombre de vacuoles dont le rôle est indéterminé (Résorption de l'ancienne membrane?). Les nucléoles sont déjà formés à l'intérieur du noyau et certains fusionnent déjà.

En bas : ($\times 7.400$). Coupe transversale du fuseau montrant l'ancienne membrane nucléaire en voie de résorption, la couche interne devenue granulaire n'existe plus qu'en trois endroits. Au centre coupe des faisceaux de microtubules. Là aussi existent un certain nombre de vacuoles dont le rôle reste indéterminé.

FIG. 17. — **Cytodiérèse** ($\times 540$).

Photo 1 : La cytotiérèse est nettement entamée, mais il reste encore une communication entre les deux amibes. Les vacuoles pulsatiles, à quelques exceptions près sont accumulées entre les deux cloisons. On remarquera que la taille des amibes est encore inégale. Les noyaux sont très difficiles à observer; il est nécessaire de faire varier la mise au point pour les apercevoir.

Photo 2 : Les vacuoles pulsatiles sont pratiquement scindées. Il persiste encore une légère communication entre les deux amibes dont la taille s'égalise. Les pseudopodes ont réapparu.

Photo 3 : Les deux amibes sont maintenant séparées, il ne subsiste plus qu'un filament très délicat qui les relie, filament visible comme un trait noir très fin sur la photographie.

Photo 4 : Le filament vient de se rompre, les deux amibes se séparent. La cytotiérèse est achevée.

FIG. 18. — Nutrition de la *Thecamoeba Sphaeronucleolus*.

En haut : A l'état vivant, les petites amibes dont se nourrit la *Thecamoeba Sphaeronucleolus*. (Contraste de phase $\times 2.200$). On remarque le noyau avec un caryosome rond central et l'existence vraisemblable d'un collopoide.

Au milieu : ($\times 2.200$). La nourriture de la *Thecamoeba Sphaeronucleolus* telle qu'elle l'absorbe. On voit ici, quatre kystes des amibes représentées plus haut à l'état vivant, au milieu des bactéries.

En bas : Coupe transversale d'une amibe colorée au bleu de méthylène montrant la formation d'une vacuole digestive par le phénomène de la « cheminée ». Le hyaloplasme se rassemble à la partie supérieure et se referme sur les bactéries et les kystes emprisonnés. Ces éléments ne sont pas visibles ici, ils ont été éliminés par la fixation. On aperçoit le noyau qui est toujours situé en dessous du fond de la vacuole en formation ($\times 1.300$).

FIG. 19. — Courbes de croissance en volume des amibes 2N + 1C et 1N + 1C (série 1) en fonction du temps.

t = temps en heures — V = volume en milliers de microns-cubes.

En traits épais : Amibes 1N + 1C.

En traits minces : Amibes 2N + 1C.

En traits pleins : courbes expérimentales.

En pointillé : droite corrigée avec pour origine le volume initial au temps zéro et pour extrémité le volume prémitotique à l'instant moyen de mitose.

Les intervalles de confiance 95 % ne sont indiqués que pour les amibes 2N + 1C afin de ne pas surcharger la figure.

Sur l'axe des temps figurent les instants des mesures et les instants moyens de mitose (37 heures pour les amibes 1N + 1C et 57 heures 30 minutes pour les amibes 2N + 1C).

FIG. 20. — Courbes de croissance en volume des amibes 2N + 2C, 1N + 2C, et 1N + 1C (série 2) en fonction du temps.

t = temps en heures — V = volume en milliers de microns-cubes.

En traits pointillés et épais : Amibes 1N + 1C.

En traits pointillés et minces : Amibes 2N + 2C.

En tirets : Amibes 1N + 2C.

Pour chaque série figurent côte à côte la courbe expérimentale et la droite corrigée avec pour origine le volume initial au temps zéro et pour extrémité le volume prémitotique à l'instant moyen de mitose.

Pour chaque point expérimental est représenté l'intervalle de confiance 95 %.

Sur l'axe des temps figurent les instants des mesures; en dessous sont indiqués les instants de mitose des différentes amibes (26 heures 46 minutes pour les amibes 1N + 1C; 23 heures 55 minutes pour les 2N + 2C; 18 heures pour les 1N + 2C).

FIG. 21. — Courbes de la croissance en volume des différentes amibes.

Les indications des différentes séries expérimentales sont portées à l'extrémité des droites. Les intervalles de confiance 95 % sont également figurés. Sur l'axe des temps ont été indiqués les instants moyens de mitose.

FIG. 22. — Histogramme de la croissance en volume.

La valeur de l'amibe normale (1N + 1C) est prise arbitrairement pour unité. Les valeurs des autres séries sont ensuite rapportées à cette unité. L'erreur des mesures conduit à une approximation de 0,2 en plus ou en moins par rapport à la valeur calculée.

FIG. 23. — Histogramme de la longévité.

La valeur de l'amibe normale est prise arbitrairement pour unité. Les autres valeurs sont calculées par rapport à elle. L'erreur des mesures est de l'ordre de $\pm 0,2$.

FIG. 24. — Histogrammes comparés de la longévité et du rapport nucléocytoplasmique.

A gauche : Longévité. A droite : Rapport nucléocytoplasmique en volume. Dans les deux cas la valeur pour l'amibe normale est prise arbitrairement pour unité.

FIG. 25. — Histogramme de la pente.

FIG. 26. — Evolution de certains organites après énucléation.

- 1) *Dictyosomes* ($\times 38.000$ environ). Photos N° 1 et 2 : 2 heures après énucléation. Photo N° 3 : 8 heures après énucléation. Photos N° 4 et 5 : 16 heures après énucléation. Photos N° 6 et 7 : Au bout de 24 heures les altérations apparaissent : Gonflement, diminution du nombre des cisternae, dissémination des vacuoles. Photo N° 8 : Après 48 heures, il ne reste pratiquement plus de dictyosomes; celui que reproduit cette figure est l'un des moins atteints.
- 2) *Mitochondries* ($\times 42.000$ environ). Photo 9 : 2 heures après énucléation. Une granulation se trouve incluse dans la mitochondrie, ce phénomène est très fréquent. Photo 10 : 24 heures après énucléation. Photo 11 : 48 heures après énucléation, les mitochondries ont encore un aspect normal.
- 3) *Vacuoles digestives* ($\times 10.000$ environ). Photo 12 . Aspect normal, 2 heures après énucléation. Photo 13 : 8 heures après énucléation les vacuoles sont remplies d'une substance homogène. A 16 heures (photo 14), à 24 heures (photo 15) et jusqu'à la lyse cellulaire, les vacuoles sont vides ou contiennent encore quelques résidus de digestion.
- 4) *Membrane cellulaire* ($\times 63.000$ environ). Depuis 2 heures (photo 16) jusqu'à 16 heures après énucléation (photo 17), la membrane cellulaire reste normale. Après 24 heures (photo 18) elle n'est plus retrouvée que sous la forme de fragments, probablement arrachée au cours des manipulations.

FIG. 27. — **Amibes marquées à la Thymidine ^3H ($\times 1.500$).**

En haut et à gauche : Amibe normale non marquée.

En haut et à droite : Amibe marquée à la thymidine et n'ayant pas subi de lavage.

En bas et à gauche : Amibe marquée et lavée à la thymidine froide.

En bas et à droite : Amibe normale ayant reçu un noyau d'amibe marquée. L'un des deux noyaux est fortement marqué, l'autre noyau est également nettement marqué.

Il n'existe pratiquement pas de marquage cytoplasmique (il est difficile de distinguer sur la photographie les grains de marquage des granulations cytoplasmiques).

FIG. 28. — **Mitoses d'amibes à 2 noyaux.**

La photo 1 objective le synchronisme parfait des deux noyaux en métaphase. Remarquons que les deux plaques équatoriales sont actuellement perpendiculaires ($\times 270$).

La photo 2 montre que le synchronisme n'est pas toujours rigoureux. L'étiement des fuseaux se fait ici dans deux directions perpendiculaires ($\times 270$).

Sur la photo 3 les deux noyaux sont synchrones et l'allongement des deux fuseaux se fait dans une seule direction ($\times 270$).

Les trois autres photographies ($\times 215$; $\times 215$; $\times 440$) montrent des cytodièreses en 3, 4 et 2 amibes. Remarquons que c'est une véritable performance de distinguer les noyaux à ce stade d'évolution des cellules.

FIG. 29. — **Fusions nucléaires ($\times 500$).**

Les 2 photographies du haut montrent une fusion de noyaux : Le premier stade (à gauche) se situe juste après la reconstitution du caryosome, le deuxième (à droite) 24 heures plus tard, les deux caryosomes sont en train de fusionner.

En bas, fusion de deux noyaux dans une amibe binucléée : A gauche le caryosome des deux noyaux en fusion est reconstitué tandis que celui du noyau normal ne l'est pas encore. A droite : La fusion est complète et l'on peut se rendre compte que le volume du noyau et du caryosome fusionnés est sensiblement le double de celui d'un noyau normal.

FIGURES

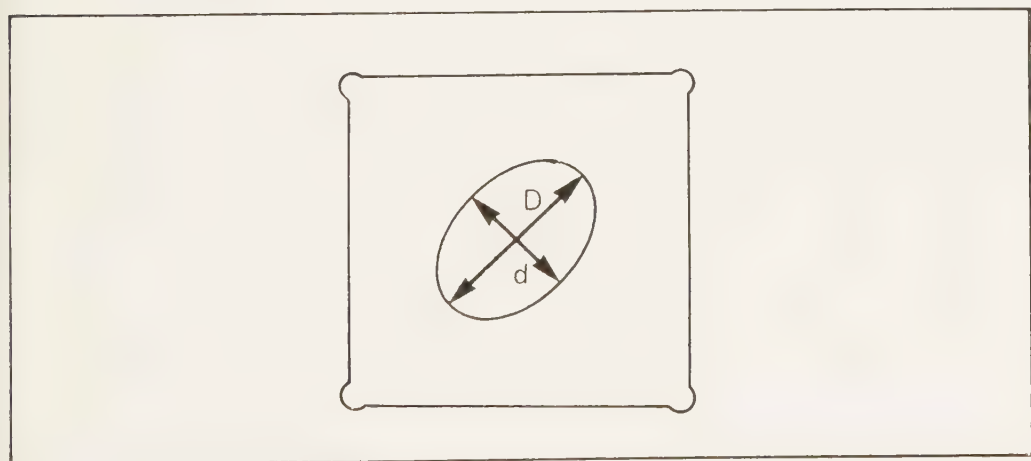
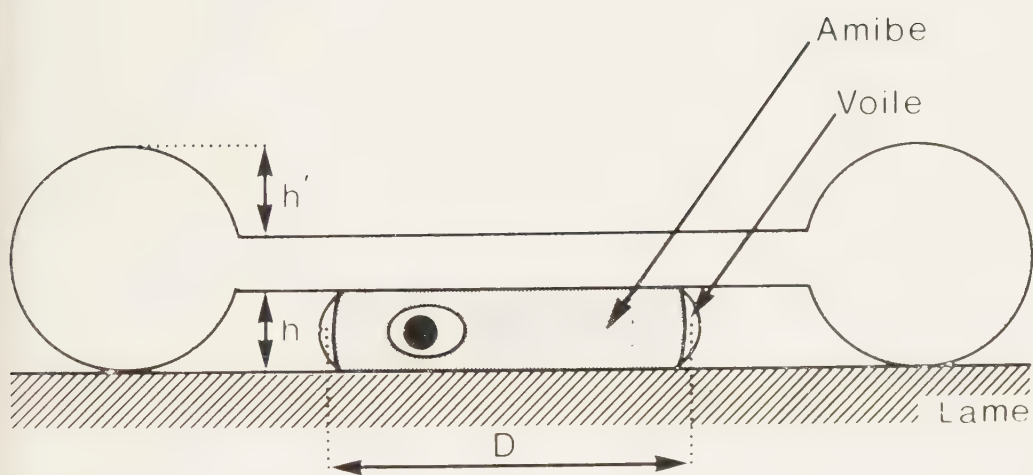


FIG. 1

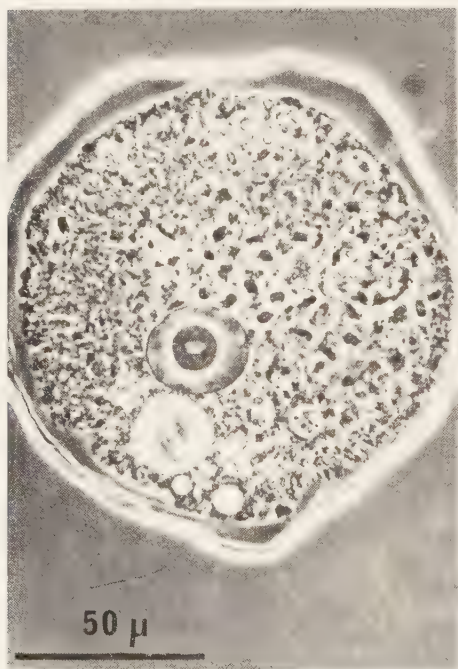
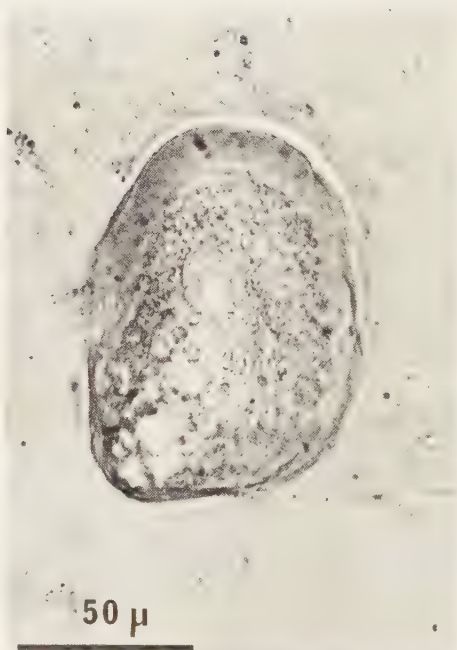
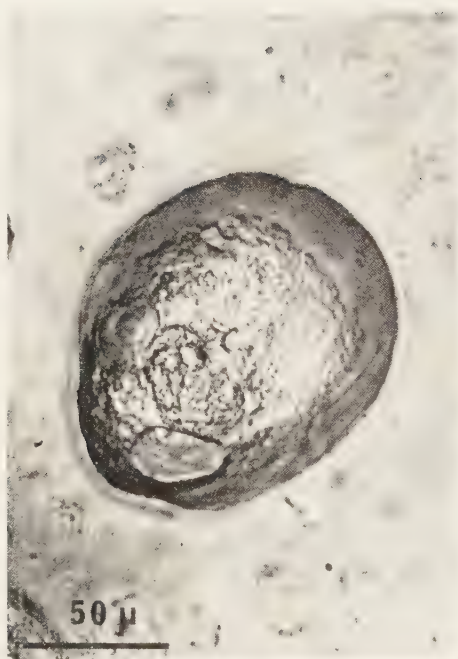


FIG. 2



FIG. 3

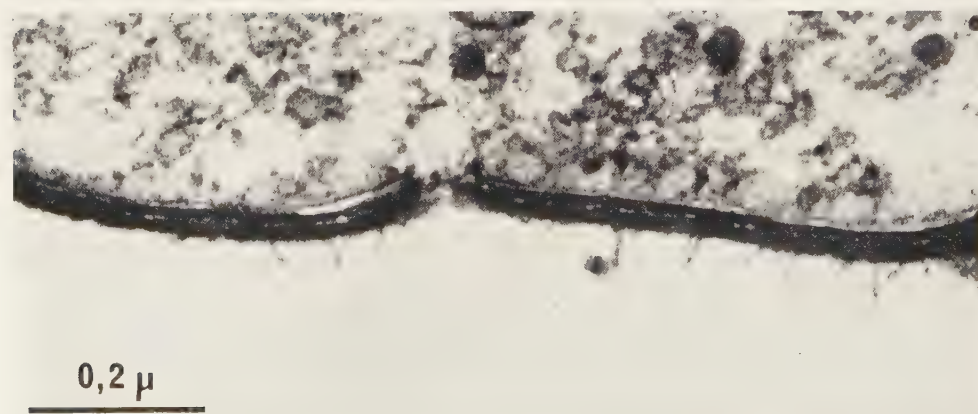
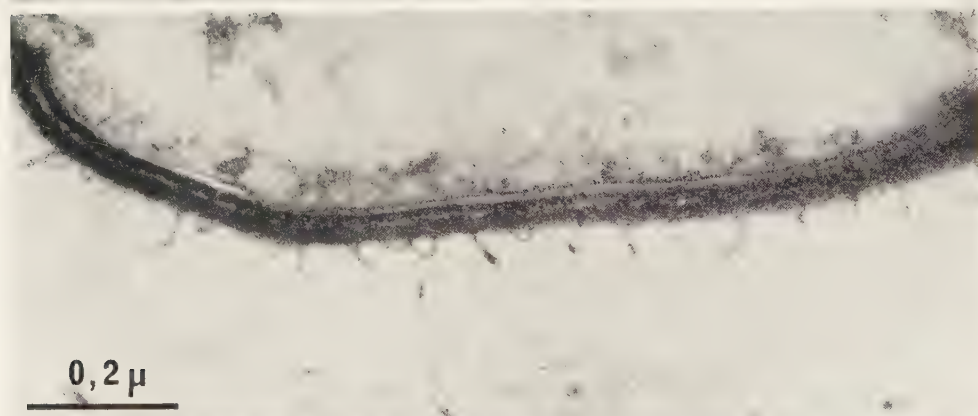
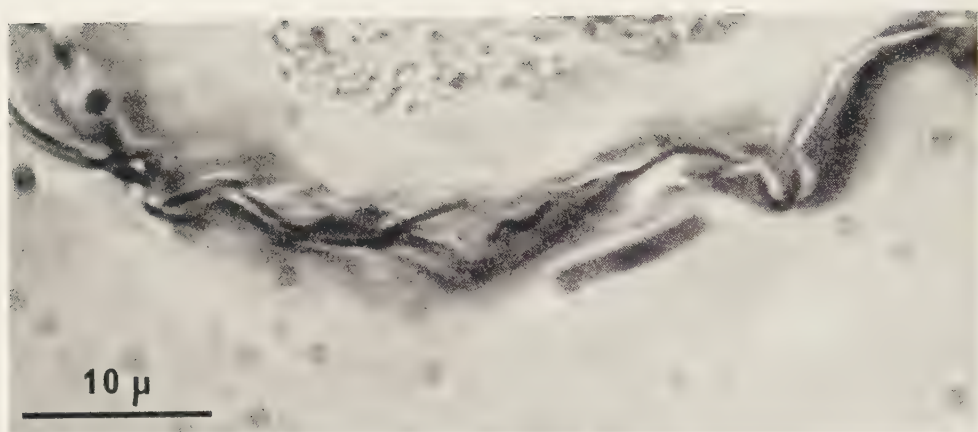


FIG. 4

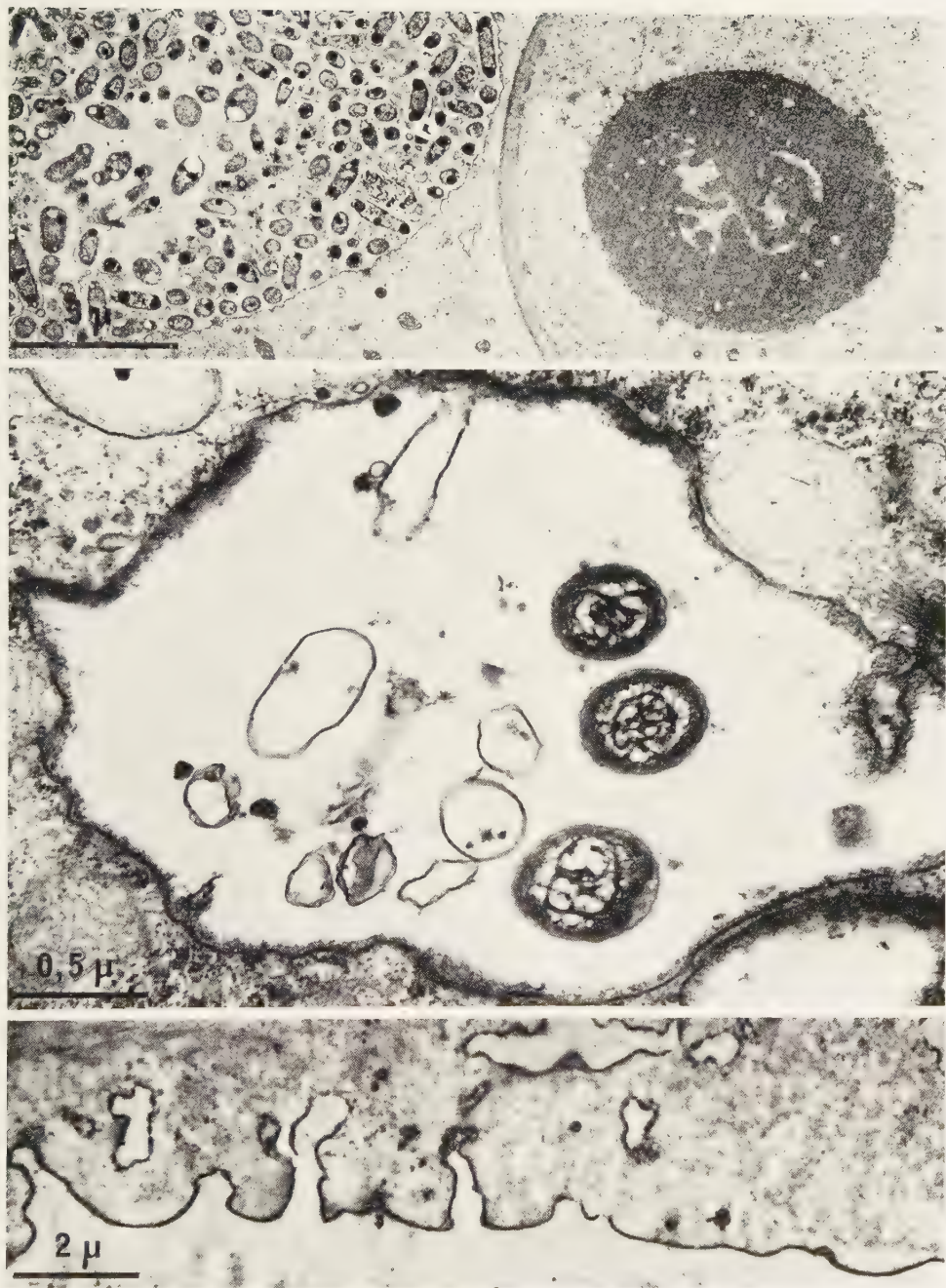


FIG. 5

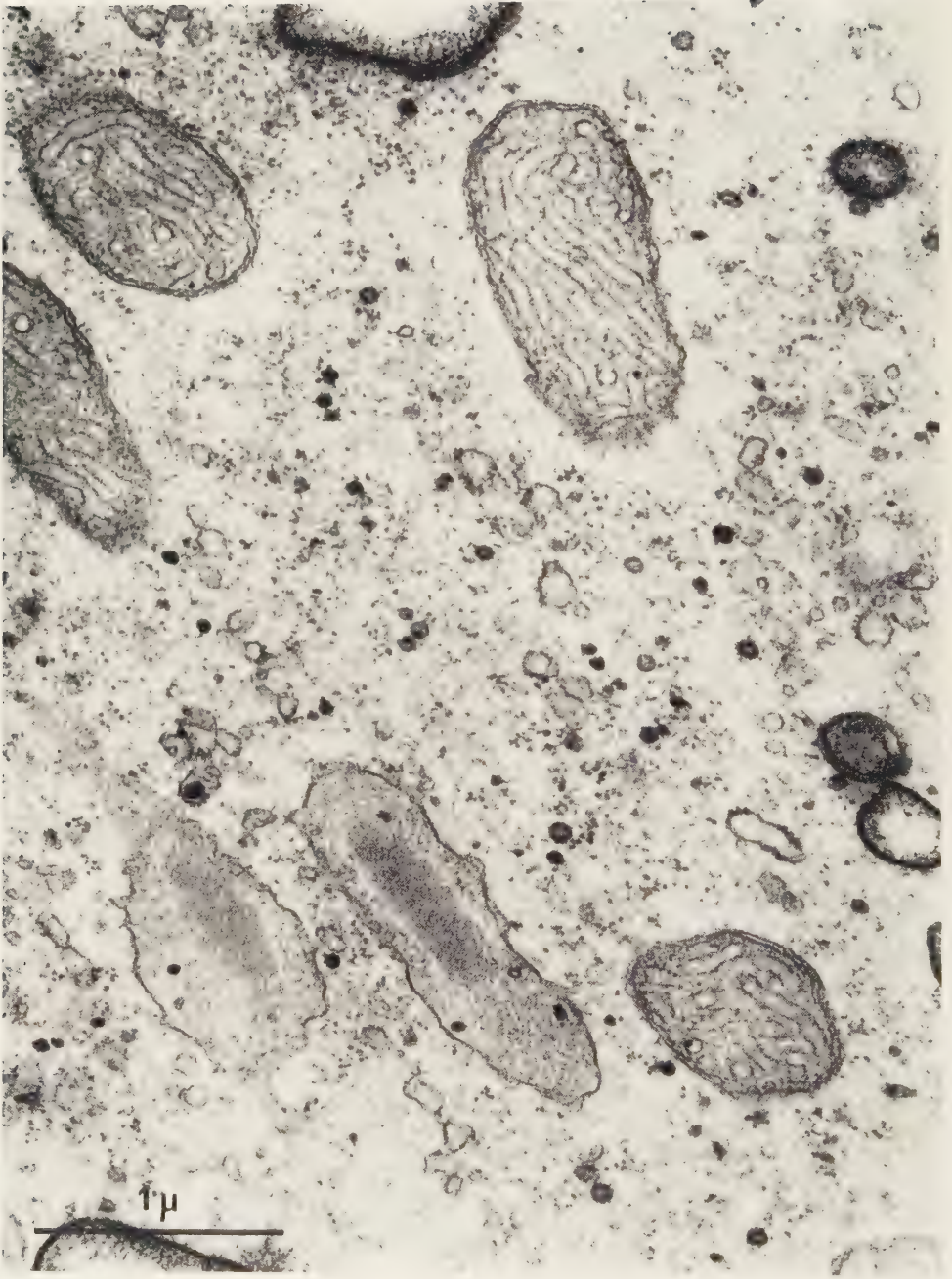


FIG. 6

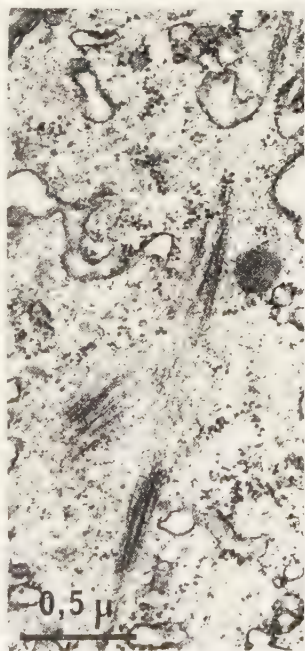
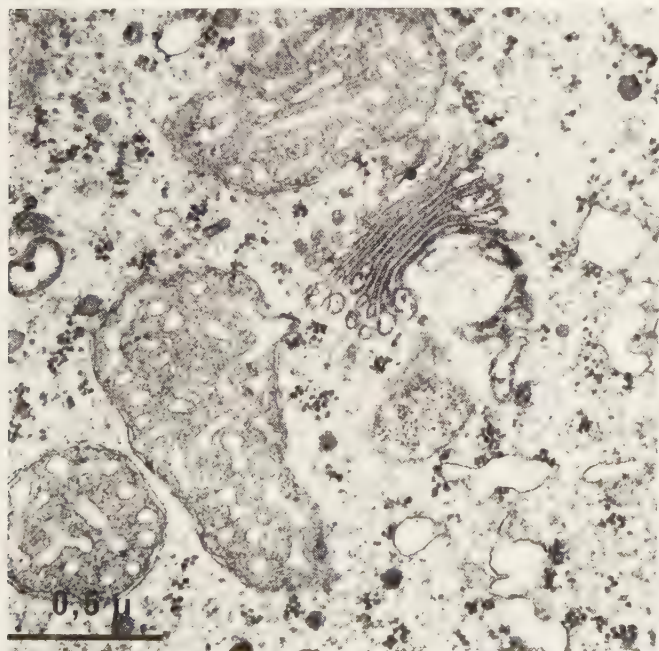
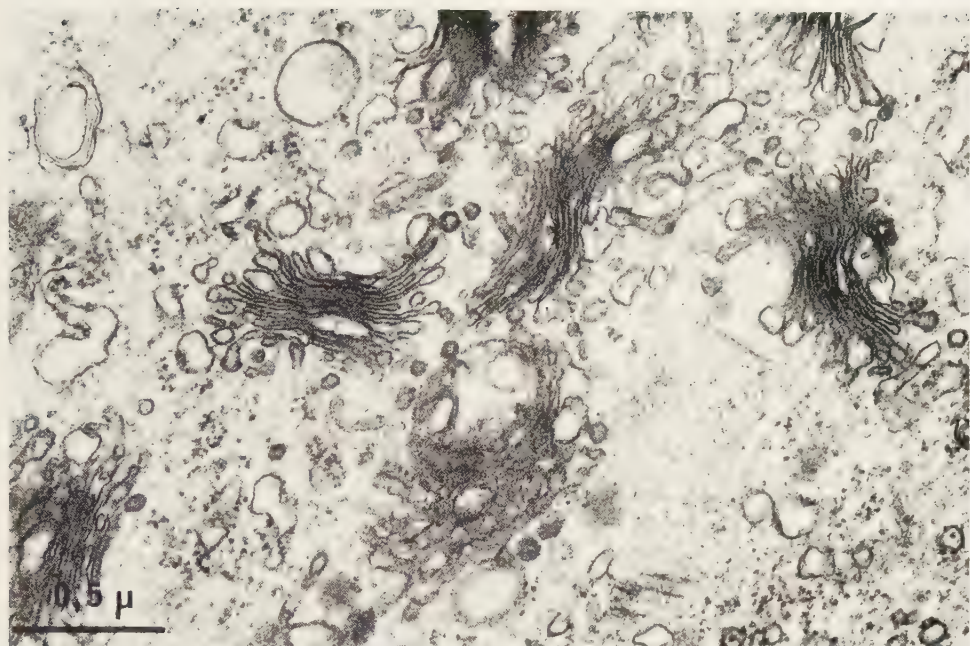


FIG. 7

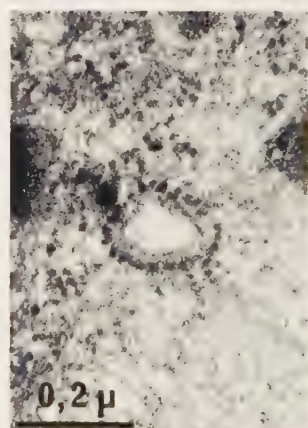
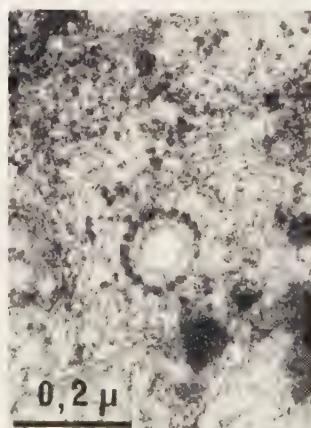
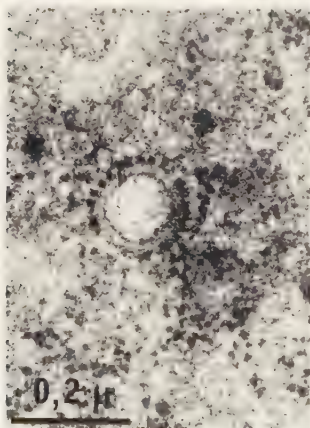
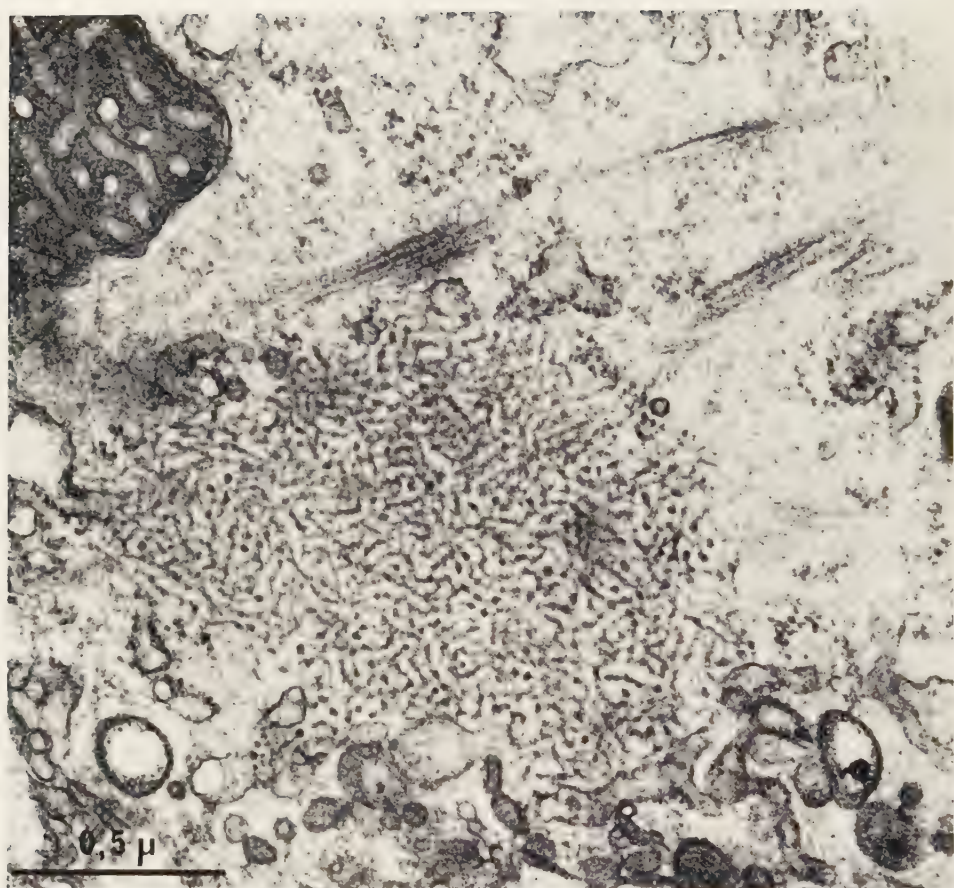


FIG. 8

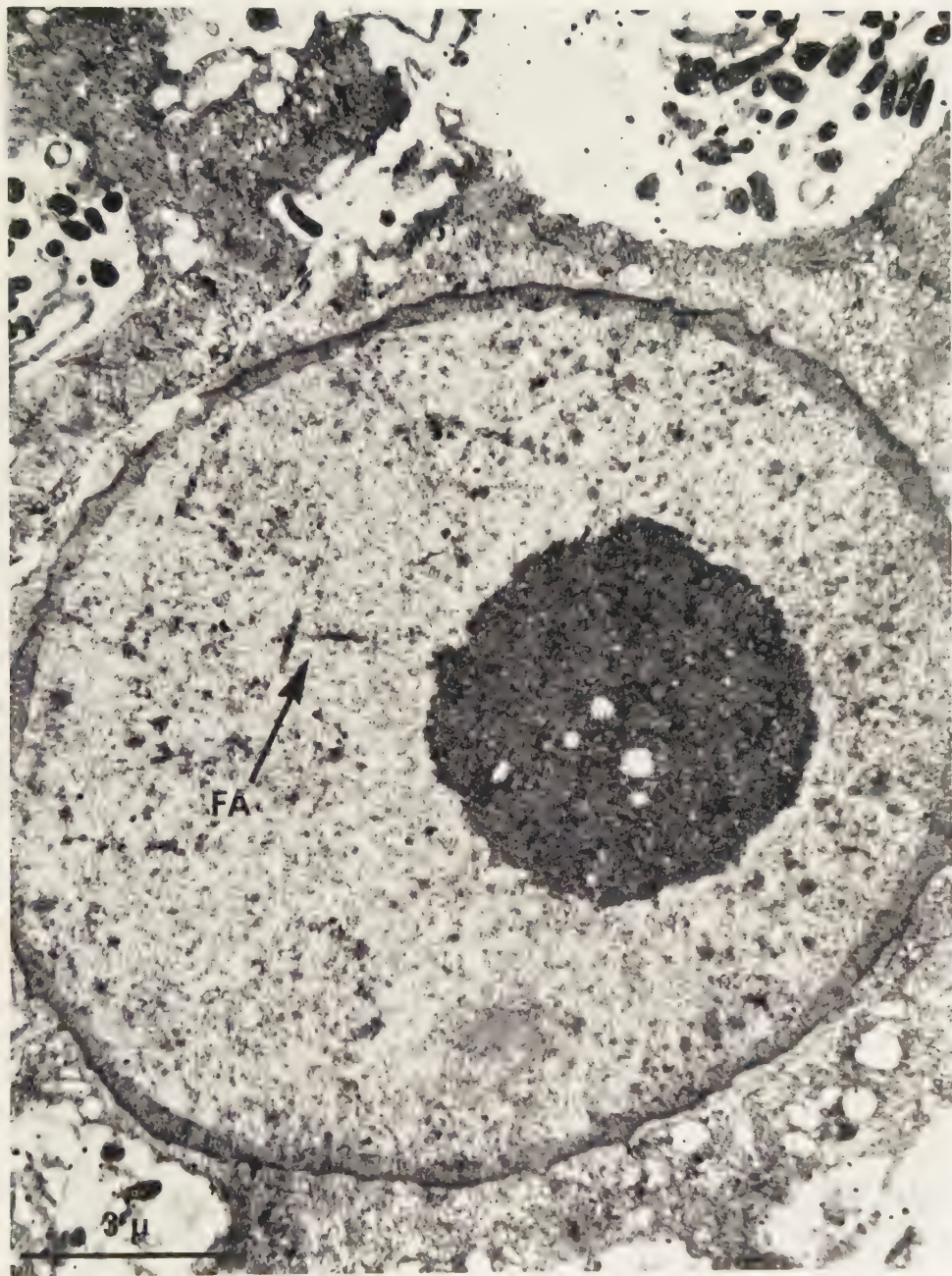


FIG. 9

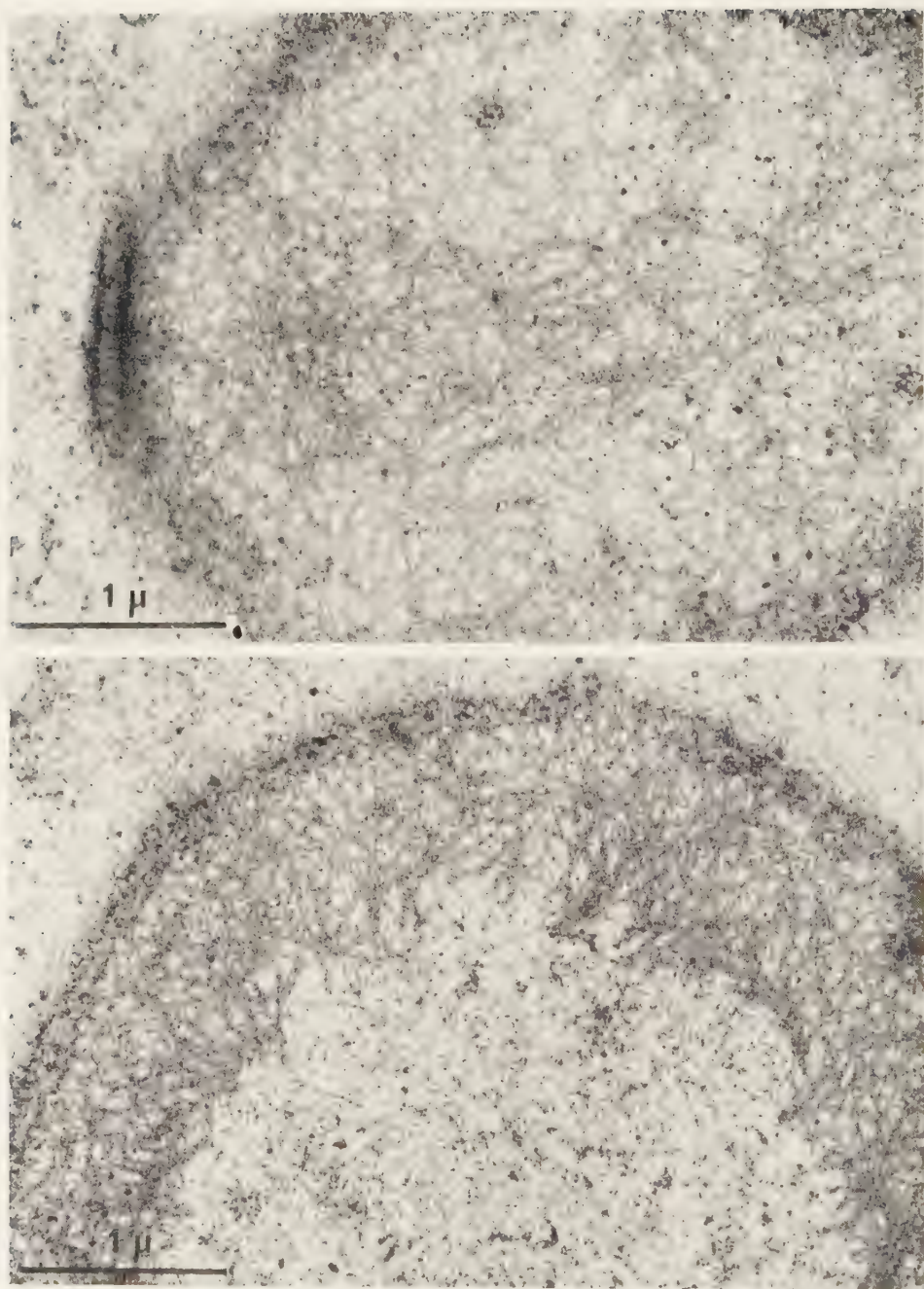


FIG. 10

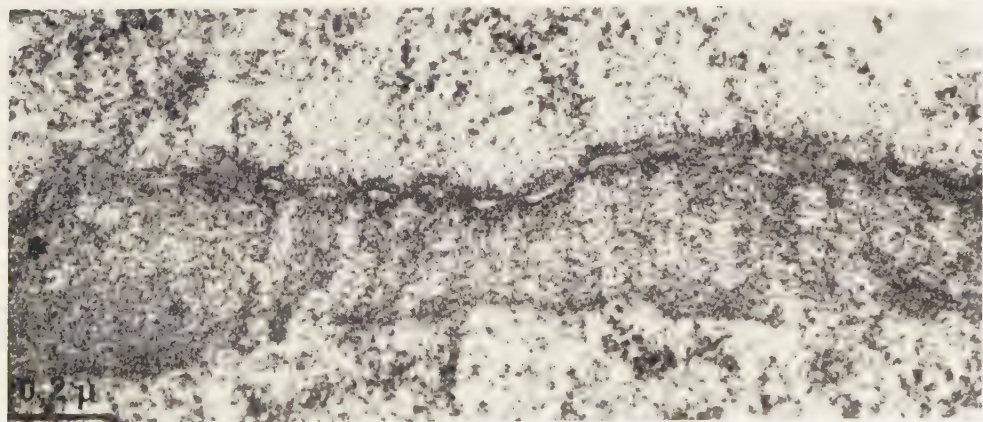
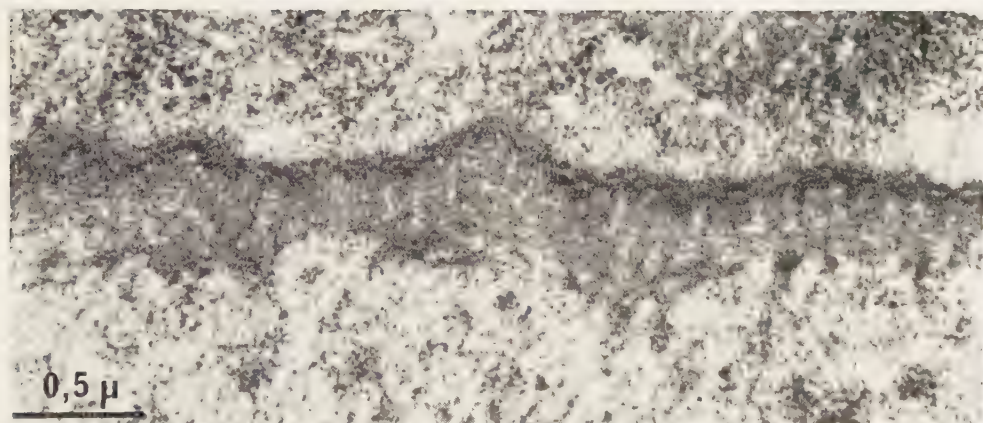
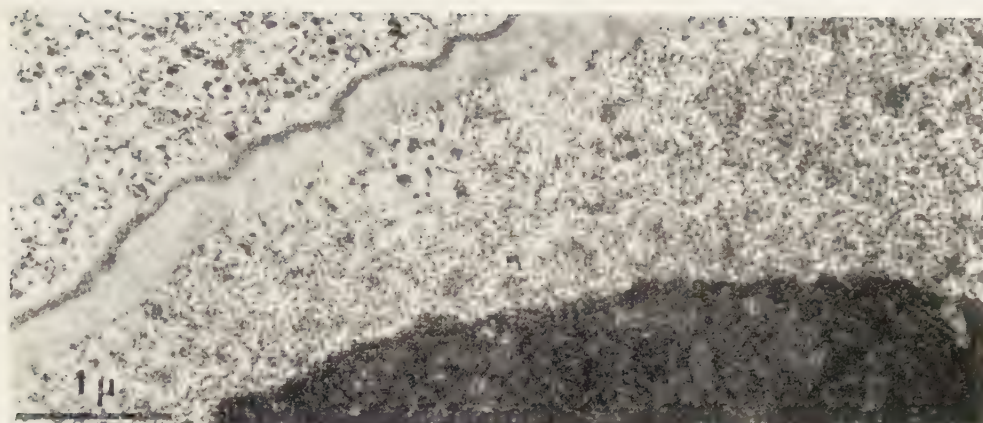


FIG. 11

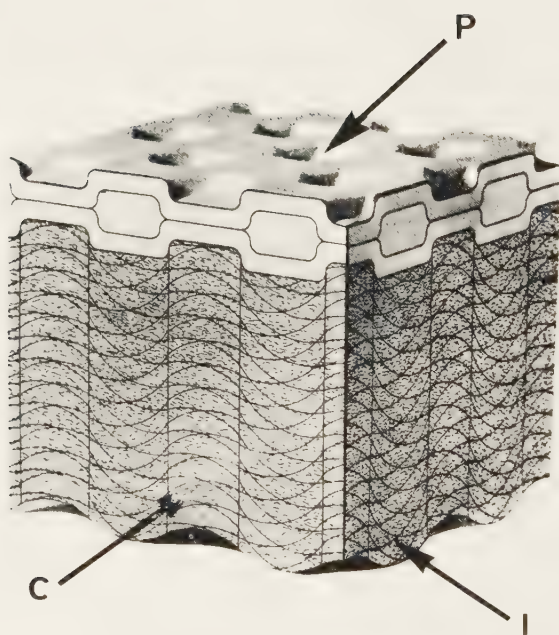


FIG. 12

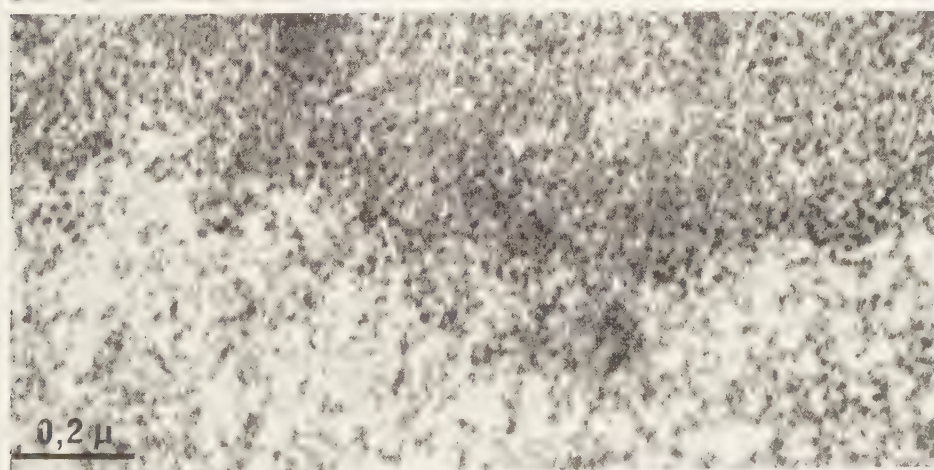
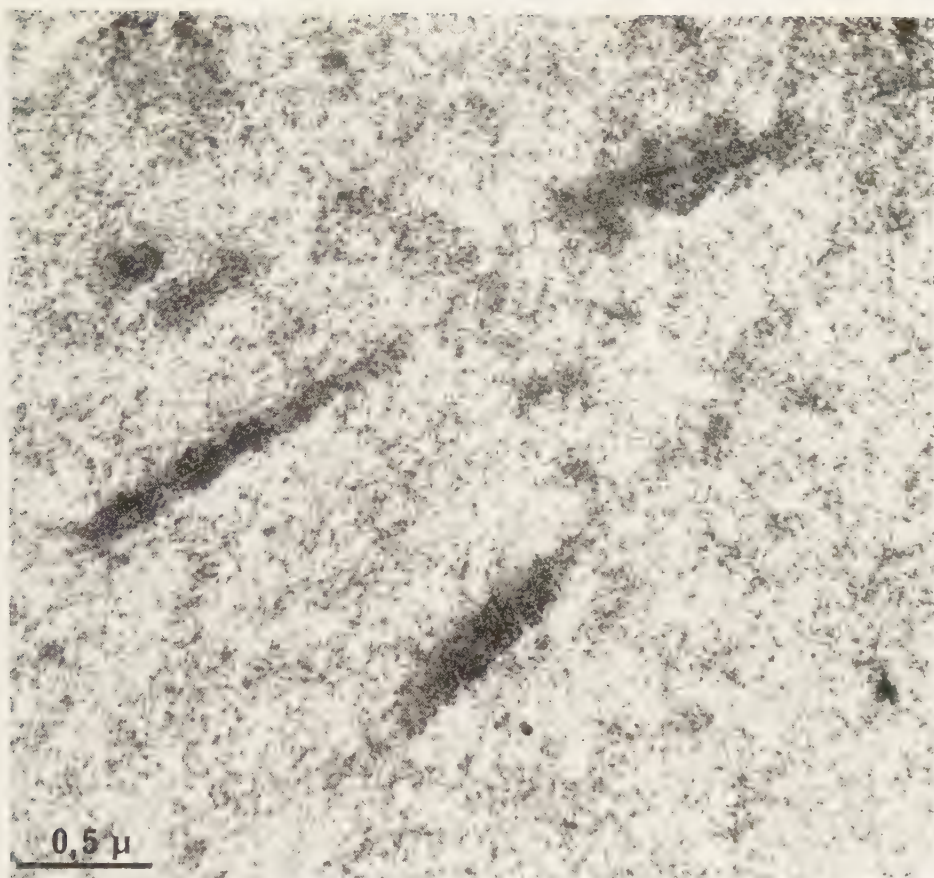


FIG. 13

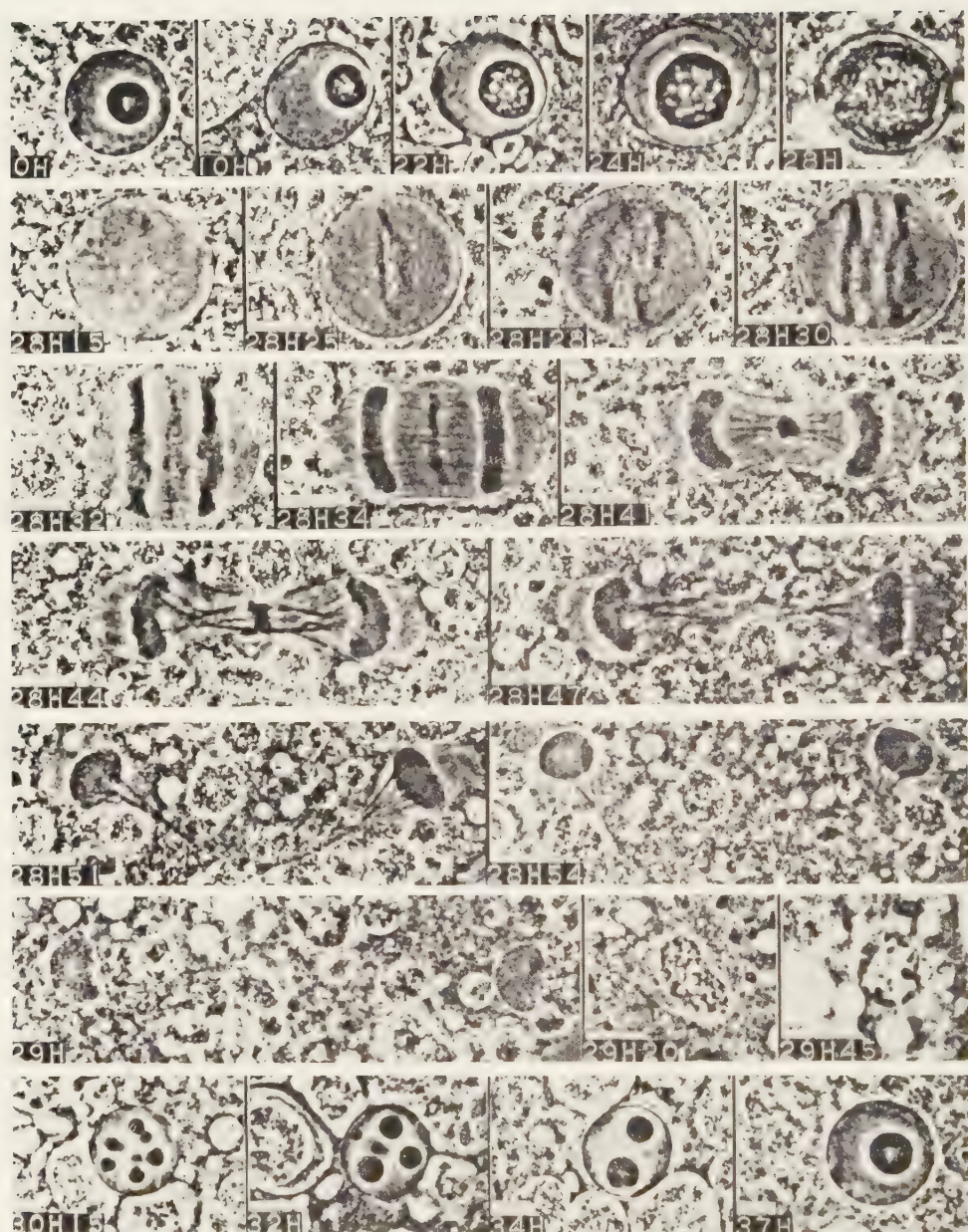
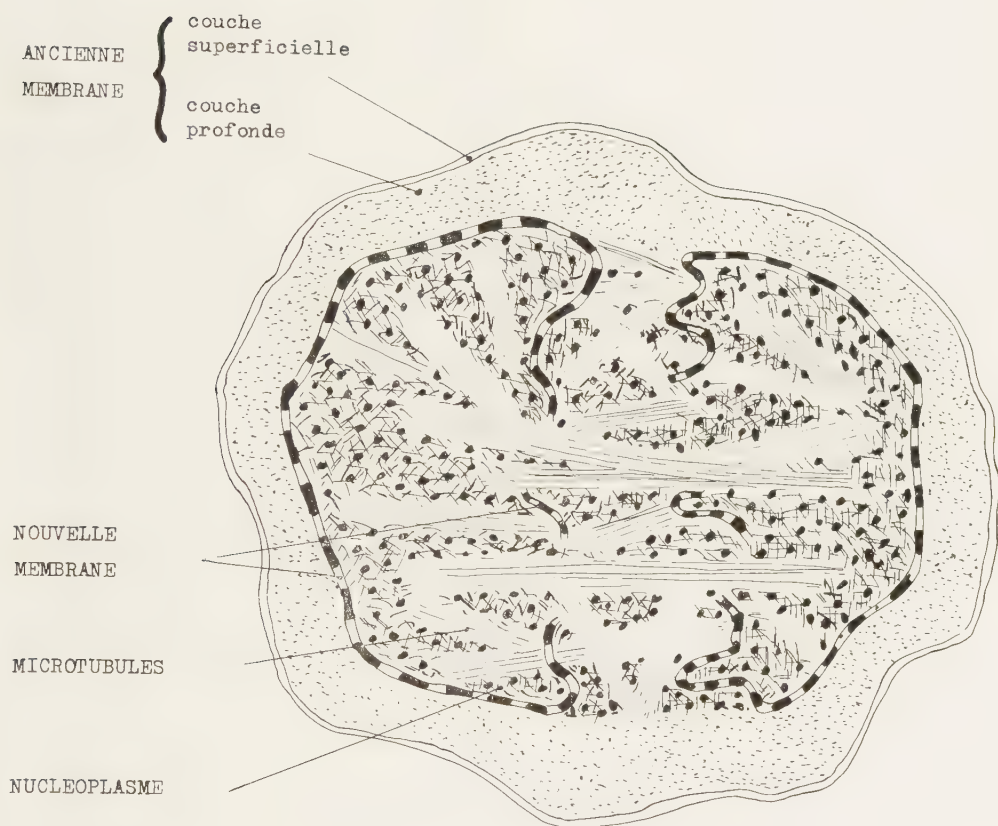


FIG. 14



SCHEMA DU "NOYAU VIDE"

FIG. 15

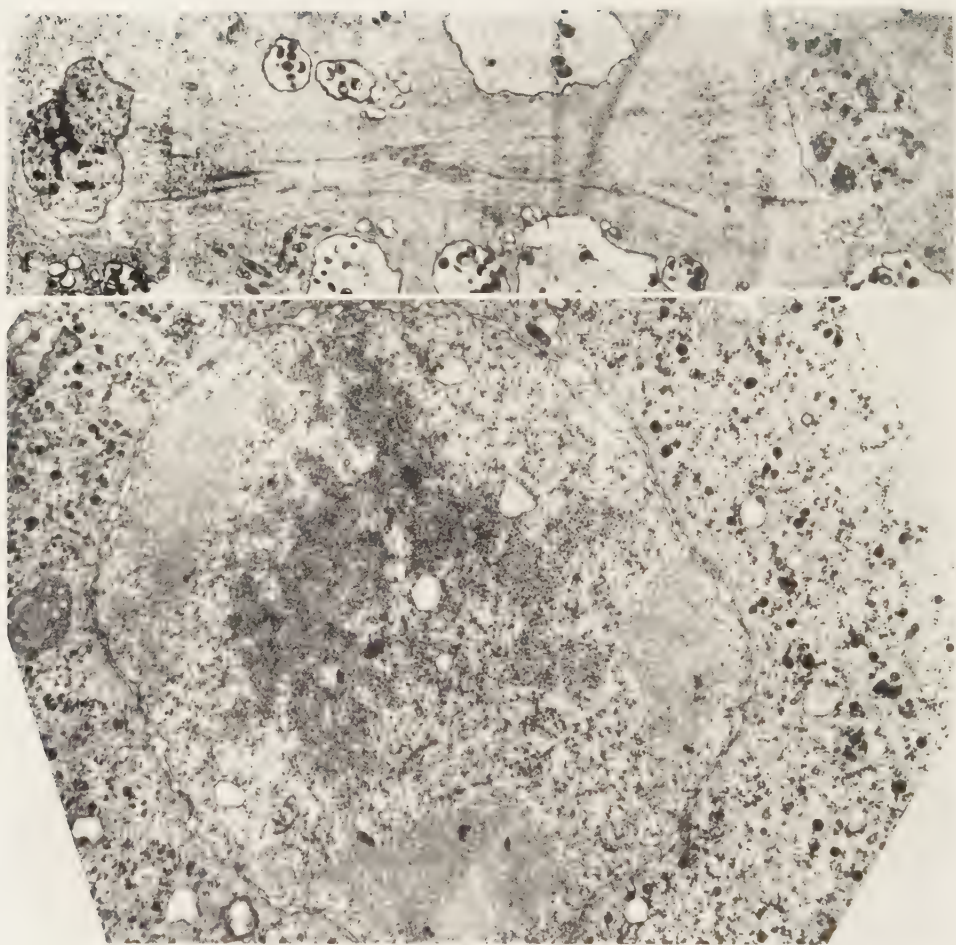


FIG. 16

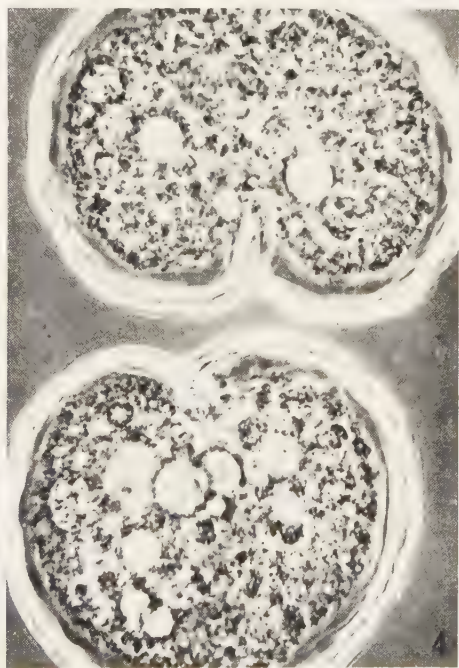
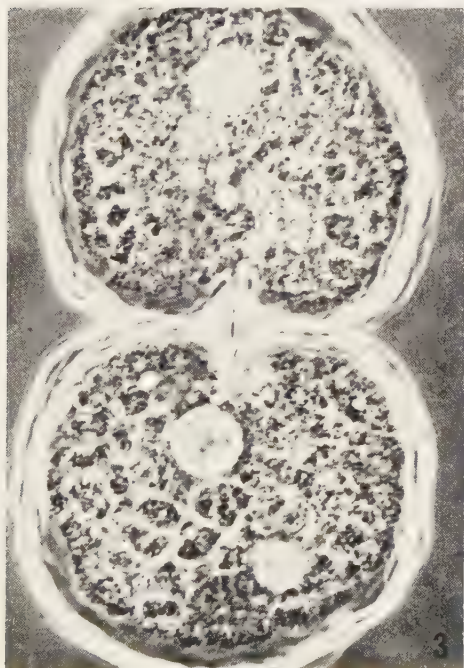
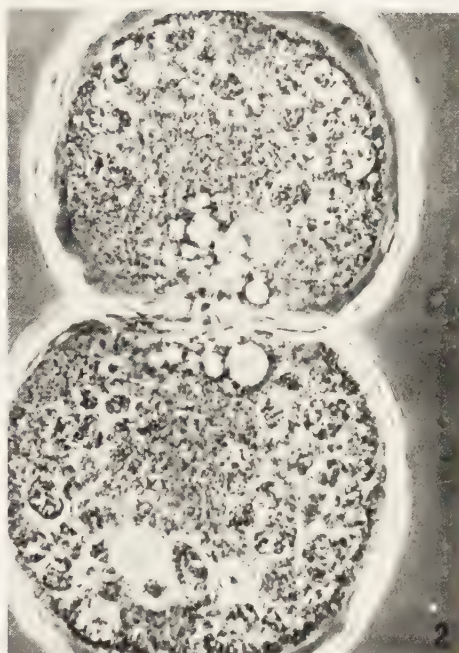
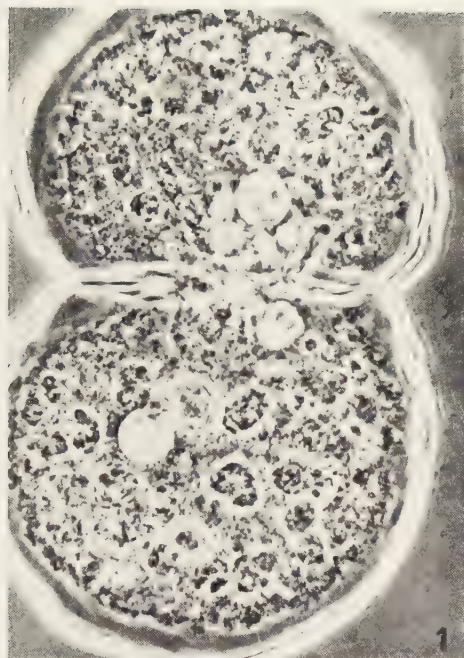


FIG. 17

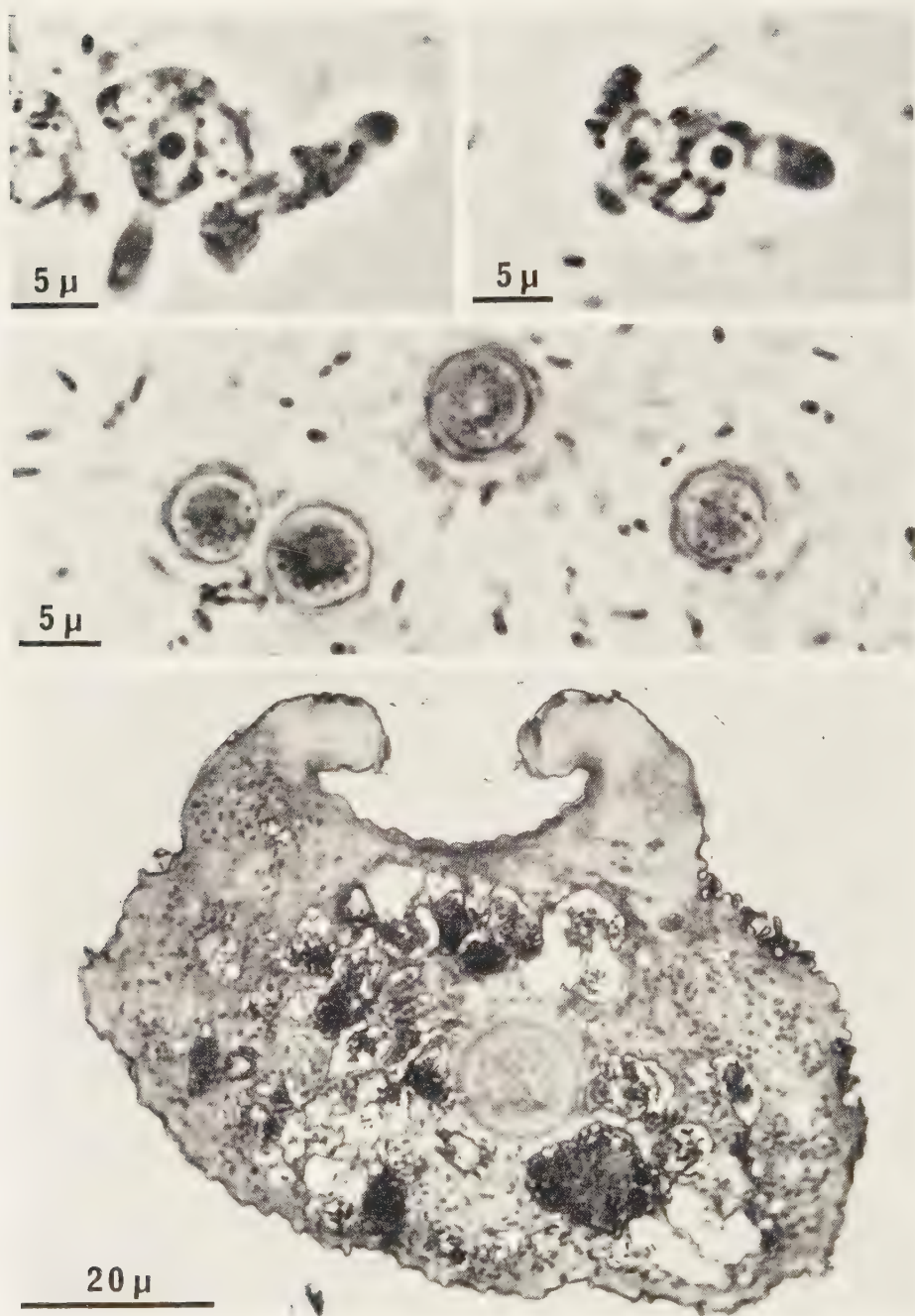


FIG. 18

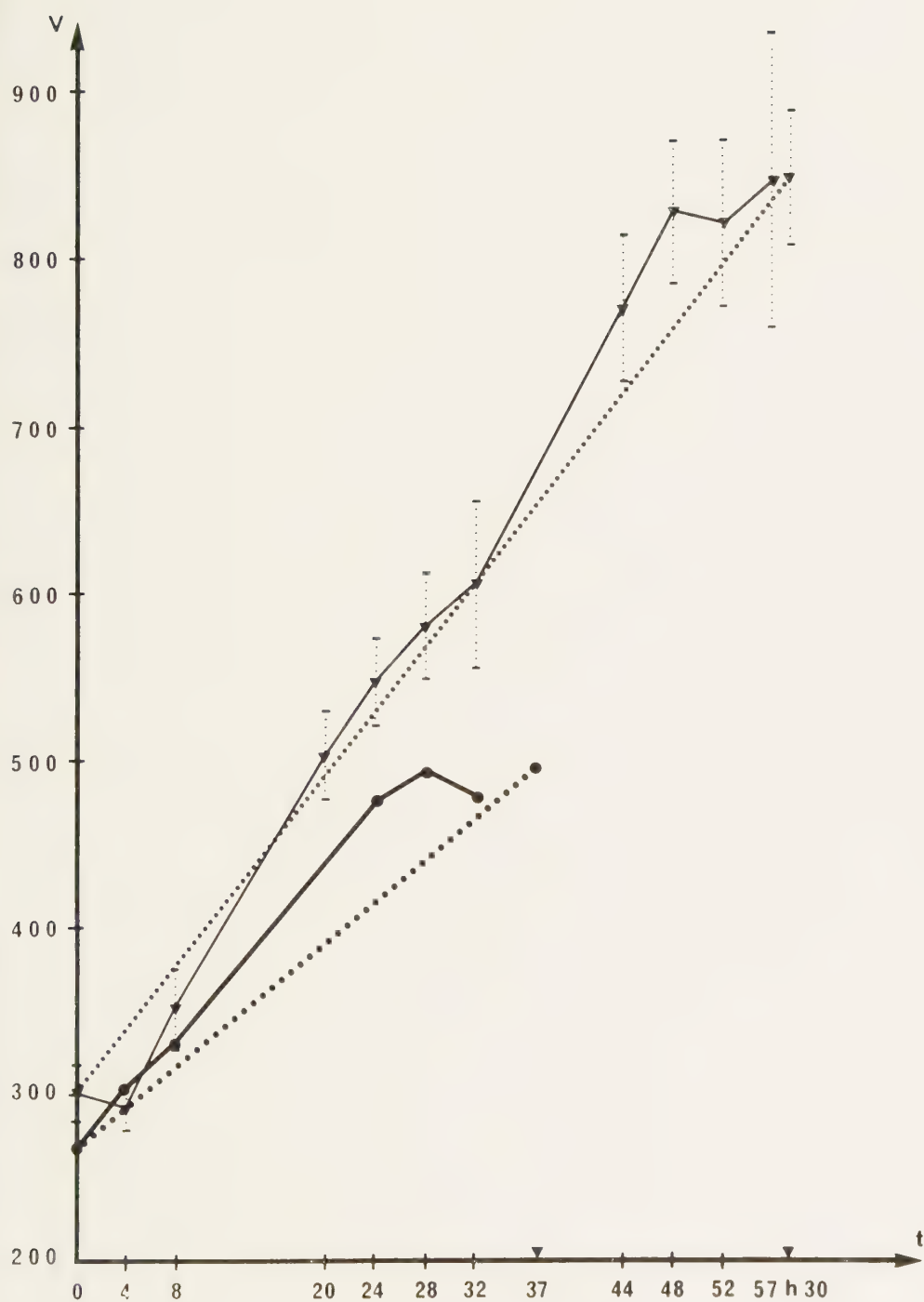


FIG. 19

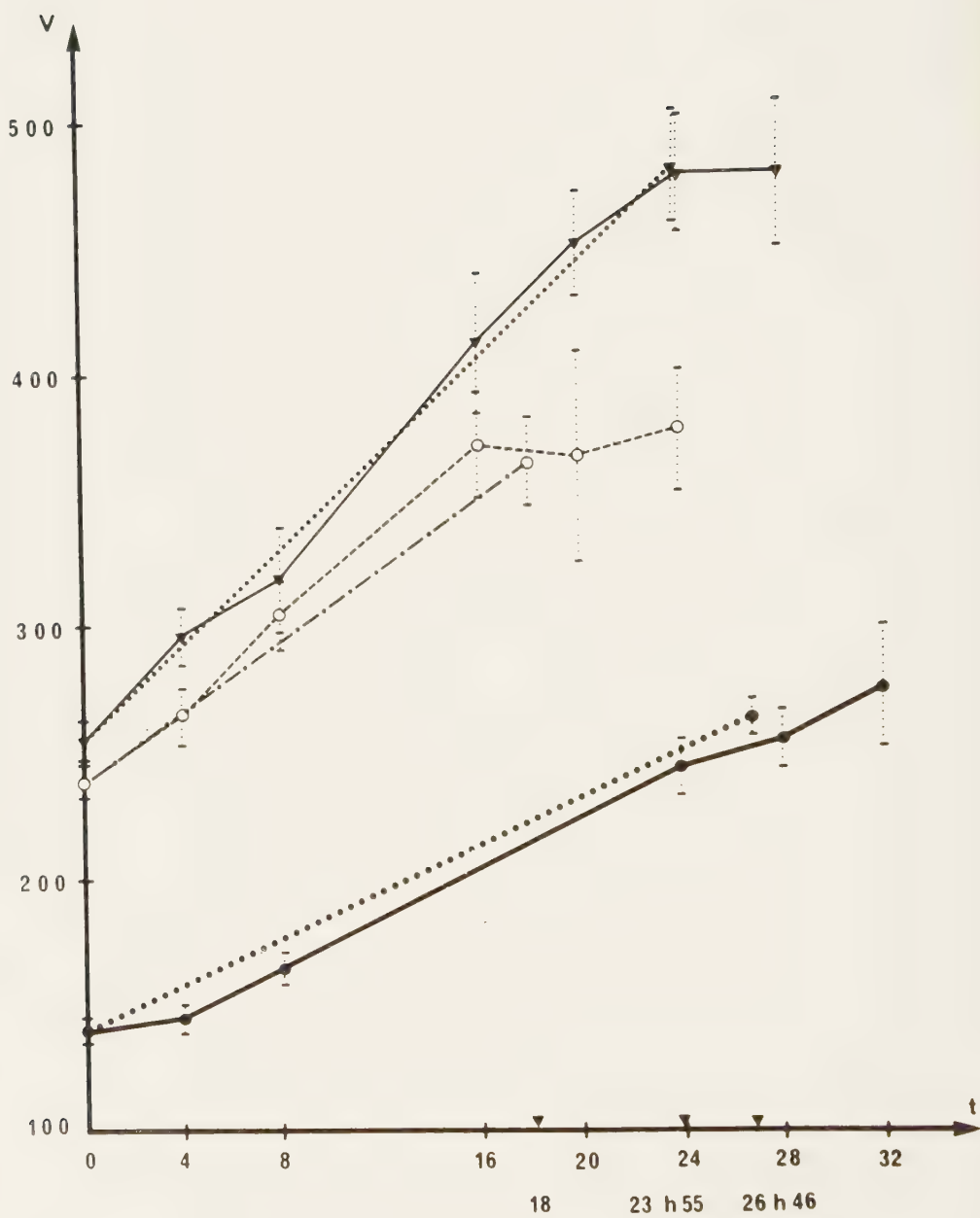


FIG. 20

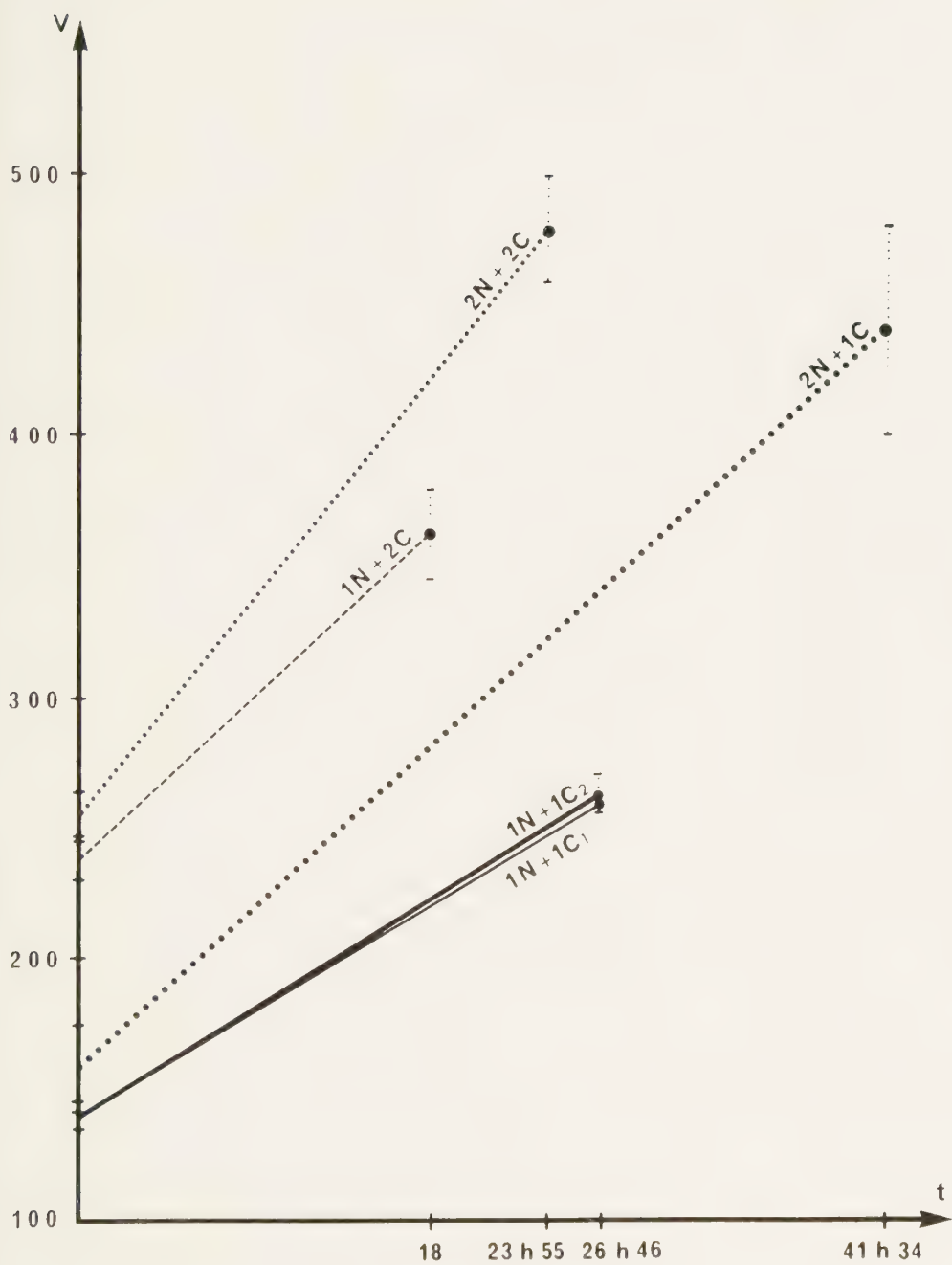


FIG. 21

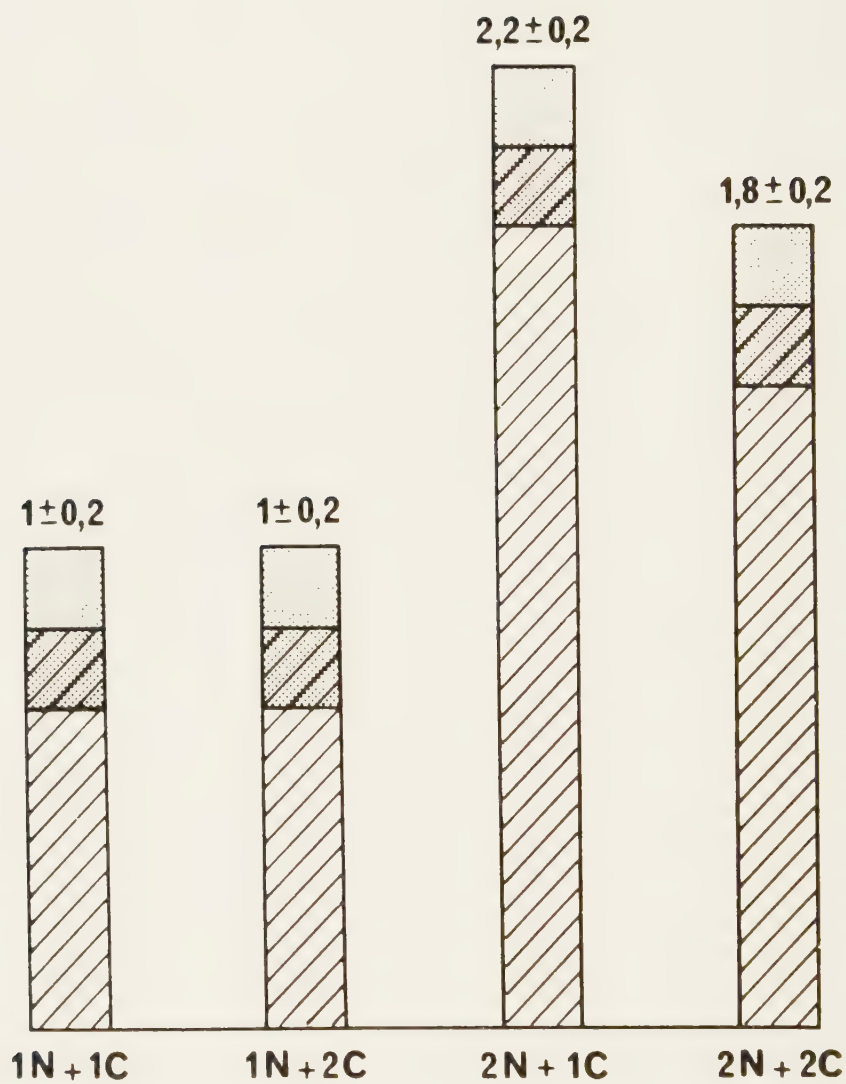


FIG. 22

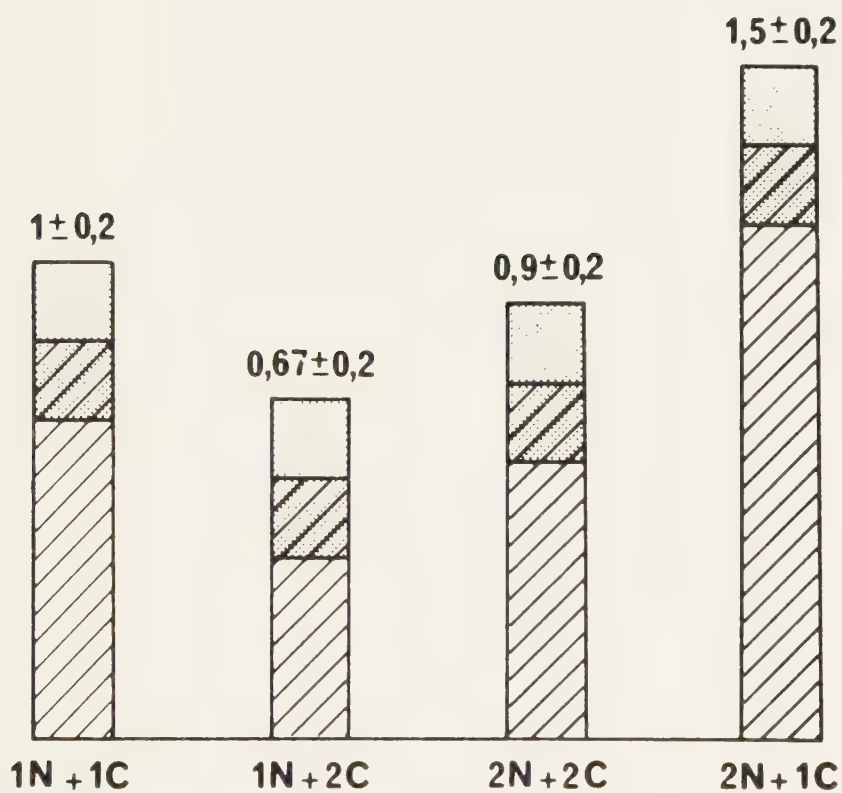


FIG. 23

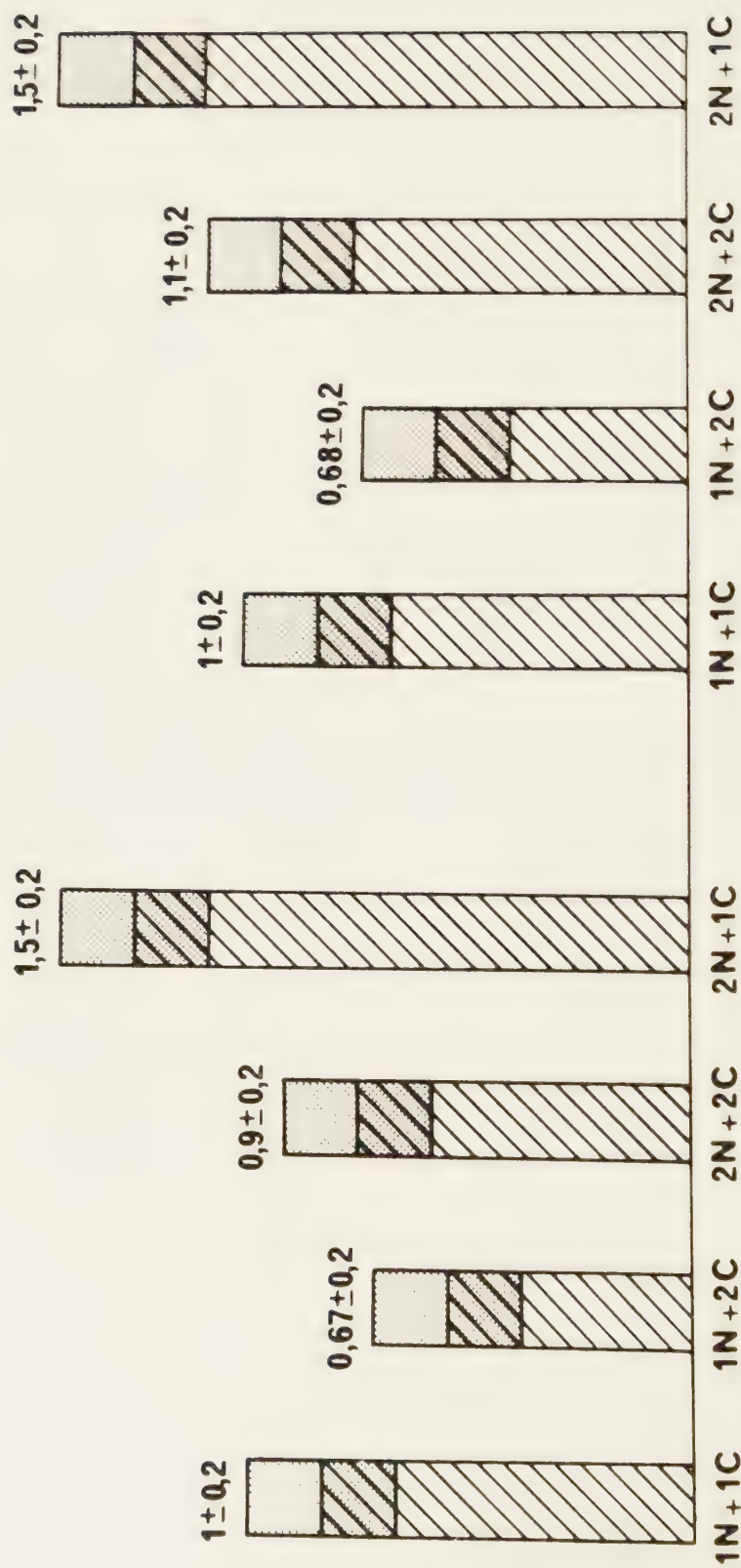


Fig. 24

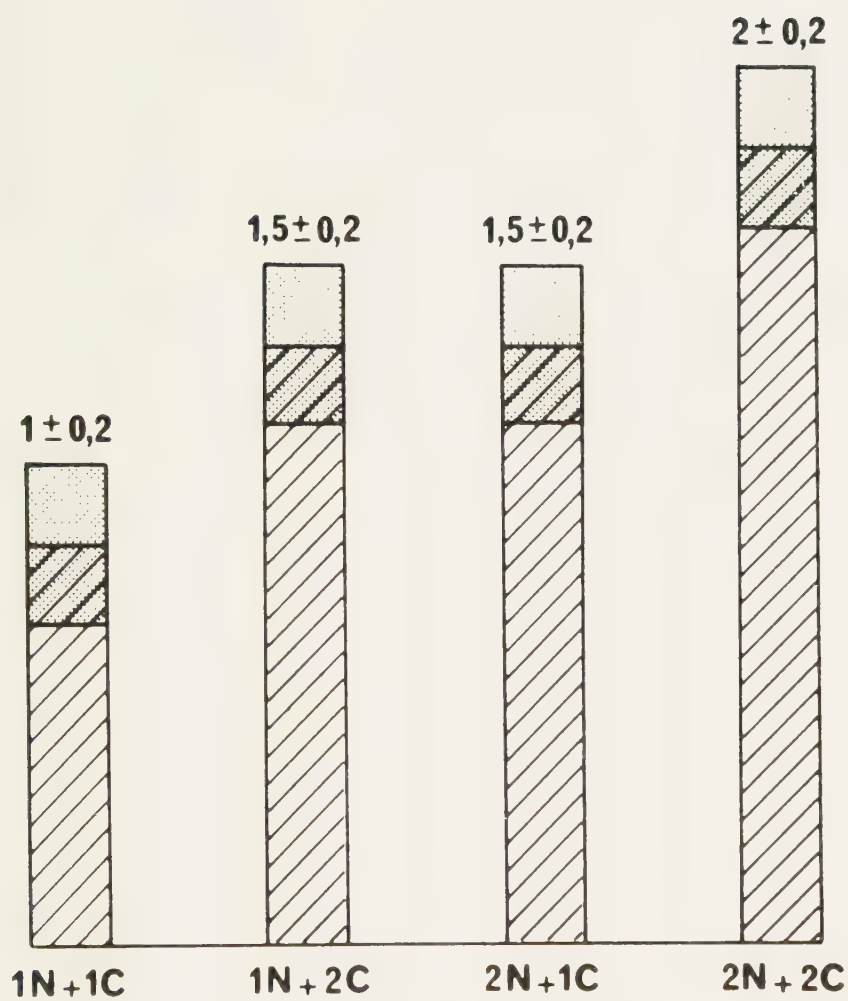


FIG. 25

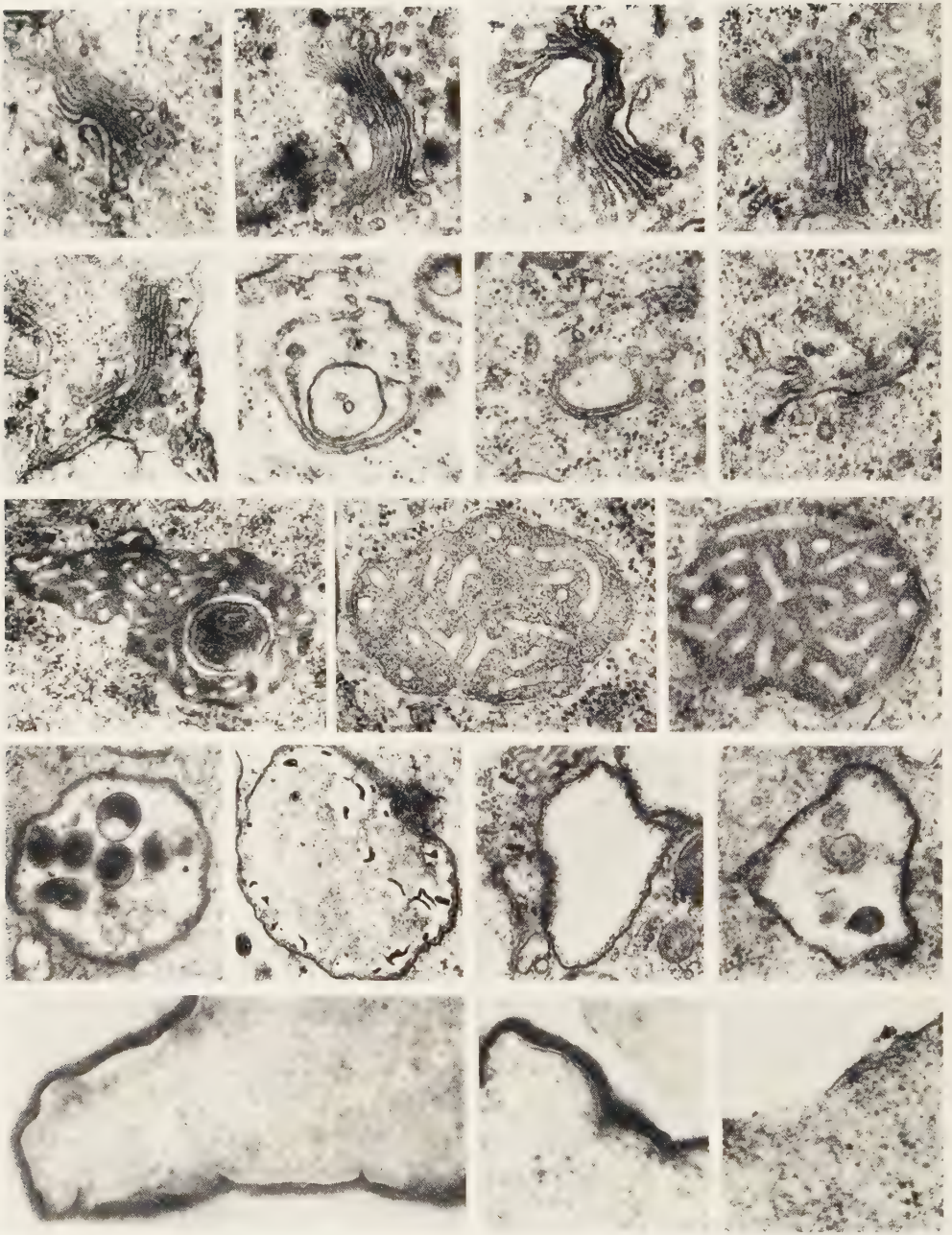


FIG. 26

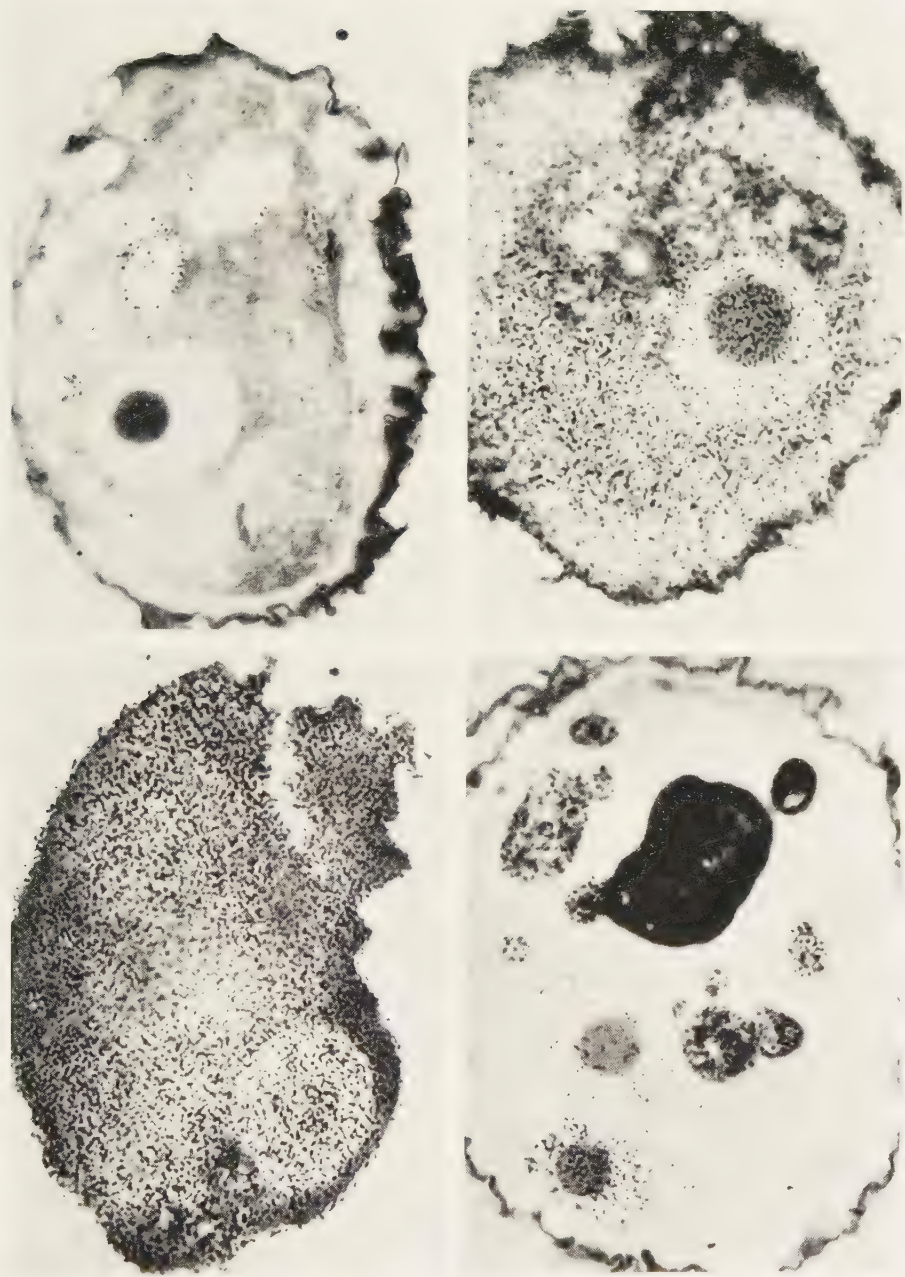


FIG. 27

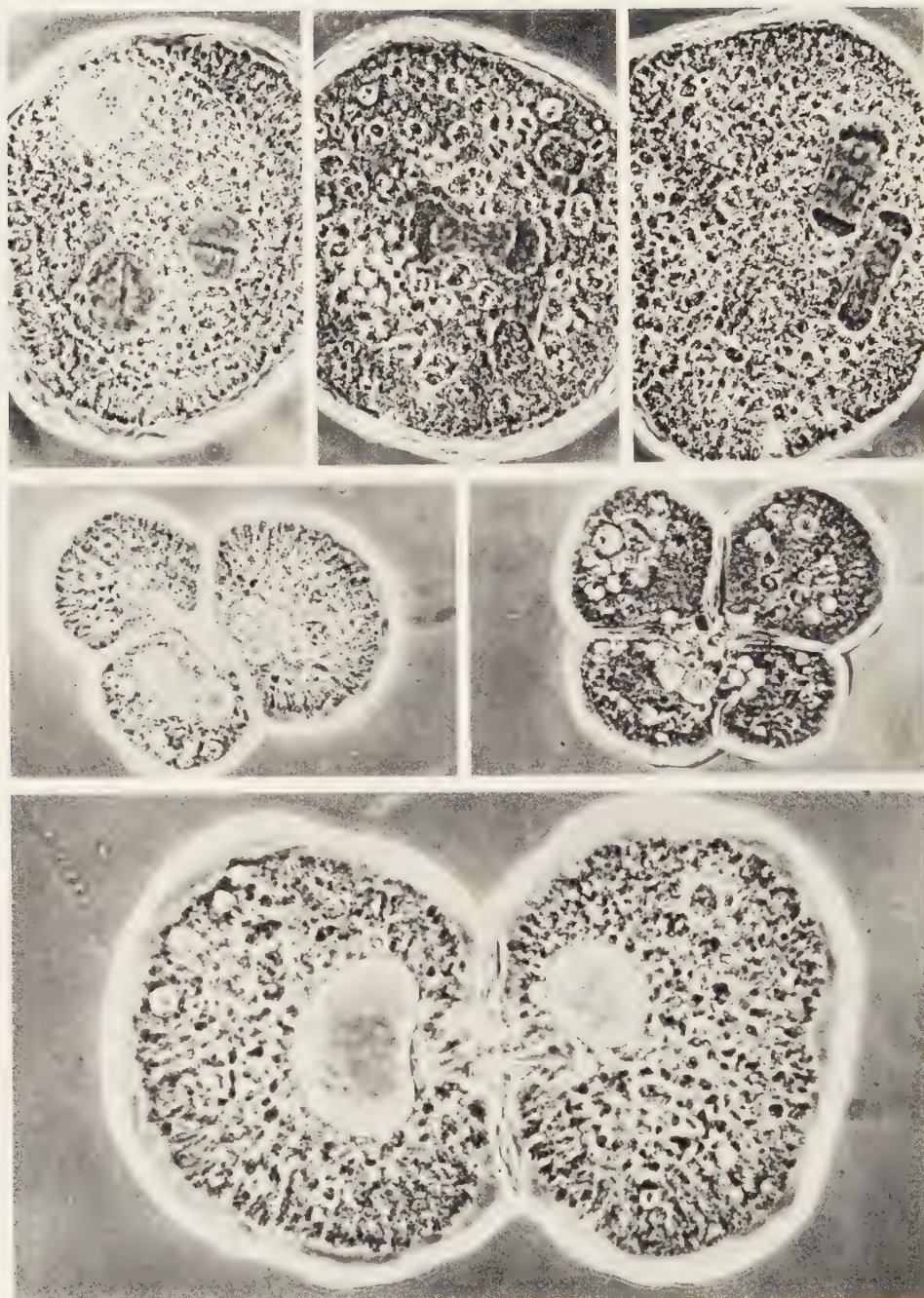


FIG. 28

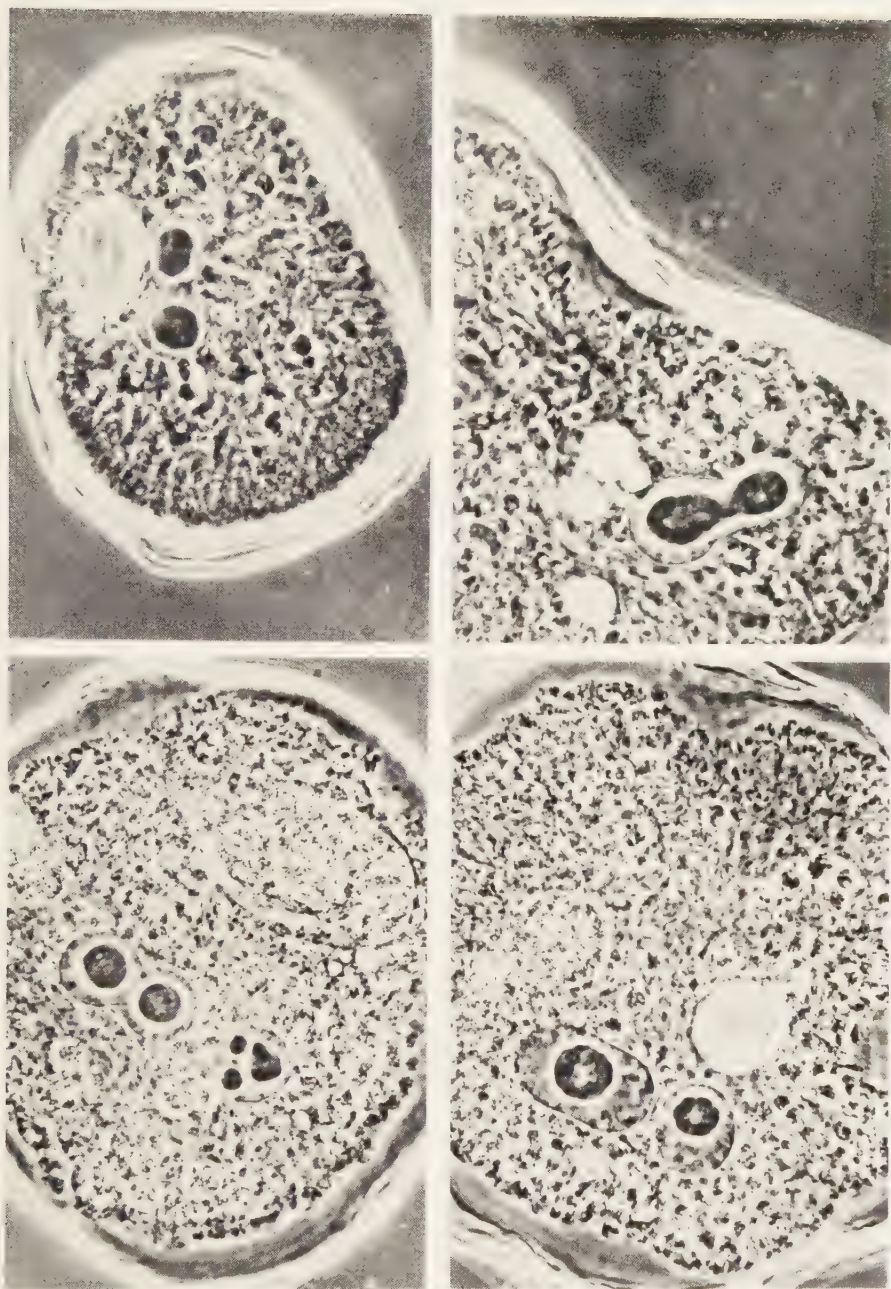


FIG. 29

